



Bab felhasználása a pontytakarmányozásban (előzetes eredmények)

Bosnyákné Egri Helga, Keszthelyi Sándor, Varga Dániel*, Kucska Balázs

Kaposvári Egyetem, Agrár és Környezettudományi Kar, 7400 Kaposvár, Guba S. u. 40.

ABSTRACT - Utilization of bean in carp feeding (preliminary results)

Author(s): Helga Bosnyákné Egri, Sándor Keszthelyi, Dániel Varga, Balázs Kucska

Affiliation(s): University of Kaposvár, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, 7400 Kaposvár, Guba S. u. 40., Hungary

Purpose of our study was to investigate the possible use of bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds damaged by weevil in pelleted carp feed. Not damaged bean was also used in an other experimental feed and a commercial carp feed was used as a control. All feeds were isocaloric and isoproteic. According to the preliminary results of the compositional analysis, damaged bean is a suitable partial substitute for fish meal in aquafeeds, but in high percentage has adverse effects on carp's performance. Further experiments are required to determine the appropriate rate of - intact or damaged - bean in fish feed.

Keywords: bean, common carp, feeding

ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérletünk célja a babzsizsik (*Acanthoscelides obtectus*, Say 1831) által károsított bab (*Phaseolus vulgaris*) alkalmazási lehetőségének vizsgálata volt pelletált pontytápanyagban. A károsított bab mellett nem károsított bab felhasználásával is készítettünk kísérleti tápot, kontrollként pedig egy kommersz pontytápanyagot használtunk, amelynek fehérje és energiatartalmával megegyezőként állítottuk össze a kísérleti tápjainkat. Az előzetes eredmények alapján megállapítható, hogy a bab táplálóanyag tartalmát tekintve alkalmas pontytáp összetevő, azonban 70% körüli arányban alkalmazva rontja a halak teljesítményét. A halliszt részleges vagy teljes kiváltásában való felhasználásához a megfelelő mennyiség meghatározása további vizsgálatokat igényel.

(*Kulcsszavak:* bab, ponty, etetés)

BEVEZETÉS

Hazánkban a legelterjedtebb technológia a félintenzív tavi haltermelés, melynek lényege a tavak biológiai produkciójának fokozása trágyázással, és az így

*CORRESPONDING AUTHOR

Kaposvári Egyetem, Agrár- és Környezettudományi Kar
7400 Kaposvár Guba S. u 40., Tel.: +36-82-505-800
E-mail: varga.daniel@ke.hu

előállított természetes táplálék kiegészítése abraktakarmányokkal. Ezek a kiegészítő takarmányok alapvetően szénhidrát forrást biztosítanak a halak számára. Amennyiben a feletetett abraktakarmány nem egészül ki a tóban megtermelődő fehérjeforrással, a túlzott energia bevitel a húsminőség romlásával jár, a halak elzsírosodását okozza, valamint a rosszul hasznosuló táplálékanyagok révén növekvő környezeti terheléssel számolhatunk. Ez korlátot szabhat a fehérjében alacsony abraktakarmányok alkalmazásának Varga és mtsai, 2016).

Ahhoz, hogy a hozamokat fokozzuk, a legkézenfekvőbb eljárás az etetett takarmányok minőségének javítása. Egyik lehetőség a kiegészítő takarmány fehérjetartalmának növelése. A magasabb fehérjetartalmú növényi eredetű takarmányok (pl. hüvelyes magvak, pillangósok, olajos magvak darái) a gabonához képest nagyobb hozamokat eredményezhetnek. Azonban a pillangósok gyenge emészthetősége, gyakran magas antinutritív anyag tartalma miatt nem feltétlenül bizonyulnak versenyképes takarmánynak (Krupa, 2008). Alkalmazásuk akkor lehet kifizetődő, ha emberi tápláléknak ugyan nem, de állati takarmányozásra még alkalmas állapotban, olcsón sikerül beszerezni. A hüvelyesek magas fehérjetartalmuknak köszönhetően széles körben alkalmazott takarmány alapanyagok. A szójával (*Glycine max*) és borsóval (*Pisum sativum*) ellentétben a babot (*Phaseolus vulgaris*) elsősorban emberi fogyasztásra termesztik, csak ritkán kerül felhasználásra takarmányokban. Eddigiekben csak kevés vizsgálat történt bab halakkal történő etetésével kapcsolatban. A közelmúltban afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*) (Yusuf és mtsai 2016; Solomon és mtsai, 2017), szivárványos pisztráng (*Onchorhynchus mykiss*) (Ouraji és mtsai 2016; Magalhaes és mtsai 2016) és atlanti lazac (*Salmo salar*) (De Santis és mtsai 2016) takarmányozásának esetében vizsgálták a szója kiváltásának lehetőségét különböző babfajtákkal.

Tekintettel arra, hogy ponty esetében eddig nem jelent meg publikáció a hüvelyesek, különösen bab etetésével kapcsolatban, indokoltnak tűnt kísérleteink elvégzése. A vizsgálat célja a bab, (mint magas fehérjetartalmú összetevő alkalmazási lehetőségének tesztelése volt pelletált pontytápban.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Kísérleti takarmányok

Az ép és zsizsik által károsított babot tartalmazó kísérleti takarmányok a Kaposvári Egyetem Hallaboratóriumában lettek összeállítva és legyártva. Első lépésként az alapanyagul felhasználni kívánt babok kémiai összetételének és aminosav-összetételének vizsgálata történt a Kaposvári Egyetem Élelmiszer-,

Állati Termék és Takarmány Laboratóriumában az alábbi módszerek szerint: nyersfehérje (MSZ EN ISO 5983-2:2009), nyerszsír (MSZ 6830-19:1979), nyersrost (152/2009/EK III/I), nyershamu (MSZ 5984:1992) és aminosav összetétel (MSZ EN ISO 13903:2005). A babok táplálóanyagtartalmi értékeit az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat

Az ép és károsított babok táplálóanyag-tartalmi értékei (átlag \pm szórás)

	ép bab ¹	károsított bab ²
Nyersfehérje (%) ³	27,0 \pm 0,15	31,1 \pm 0,05
Nyerszsír (%) ⁴	1,2 \pm 0	1,23 \pm 0,05
Nyersrost (%) ⁵	4,6 \pm 0,2	5,23 \pm 0,25
Nyershamu (%) ⁶	3,7 \pm 0	4,43 \pm 0,05

Table 1 Nutrient composition of intact and damaged beans; (1) intact bean, (2) damaged bean, (3) crude protein, (4) crude fat, (5) crude fiber, (6) crude ash

Második lépésben a kísérleti tápok összeállítása történt, a felhasznált összetevőket a 2. táblázat tartalmazza. A kísérleti tápok fehérje és energiatartalma úgy lett kialakítva, hogy a kontrollként alkalmazott kereskedelmi haltáppal is azonos legyen (3. táblázat). A babok darálás és nedvesítés után hőkezelésen estek át mikrohullámú sütőben (750 W, 25 perc) az antinutritív hatás megszüntetése céljából (Sharma és Seghal 1992). Ezután történt a többi összetevő hozzákeverése, majd erre alkalmas berendezéssel 2 mm-es pelletált táp készítése. A pellet szárítása szárítószekrényben történt 35 °C-on légszáraz állapotig.

Takarmányozási kísérlet

A takarmányozási kísérlet a Kaposvári Egyetem, Aquakultúra és Halgazdálkodási Intézeti Tanszékének Hallaboratóriumában került beállításra. A kísérleti állományt egynyaras pontyok (67,9 \pm 11,2 g) alkották. A kontroll és a két kísérleti tápot fogyasztó csoportba tartozó halakat egyedileg levegőztetett, 300 literes, recirkulációs rendszerben üzemelő kádakban helyeztük el háromszoros ismétlésben (N=3x3x20=180).

A takarmányozás *ad libitum* történt napi két alkalommal. A halak súlyát a kísérlet folyamán hetente mértük, hosszát pedig a kísérlet befejeztével. Az adatokból kondíciófaktort számoltunk az alábbiak szerint $CF = W / L^3 \times 100$, ahol W – élő súly (g); L – standard hossz (cm).

A kísérlet tápok látszólagos emészthetőségének tervezett meghatározása nem sikerült, mivel ezekből a halak olyan keveset fogyasztottak, ami lehetlenné tette az analízishez szükséges mennyiségű ürülék összegyűjtését.

Statistikai elemzés

Kezdetben a primer mérési adatállományból a kétszeres szórástávolságon kívüli értékek kerültek kizárásra, majd a fennmaradó adatokon normalitásvizsgálatot végeztünk (Shapiro-Wilk teszt). A különböző takarmányok növekedésre gyakorolt hatásának kimutatására egytényezős varianciaanalízist alkalmaztunk, majd a kezelésátlagok összehasonlítását Tukey teszttel végeztük. Az ép és károsított babbételek aminosav-összetételének összefüggésvizsgálata Spearman-féle korrelációanalízissel történt.

A statisztikai értékelést IBM SPSS Statistics Version 25 (1989, 2017) statisztikai programmal végeztük.

2. táblázat

A kísérleti takarmányok összetevői

Összetevők (%) ¹	T1	T2
Károsított bab ²	77,5	0,0
Ép bab ³	0,0	73,5
Kukorica keményítő ⁴	12,6	10,3
Halliszt ⁵	5,0	12,0
Napraforgó olaj ⁶	3,4	2,7
Premix	0,5	0,5
TiO ₂	1,0	1,0
Összesen ⁷	100	100

Table 2 Components of experimental feeds; (1) ingredients, (2) damaged bean, (3) intact bean, (4) maize starch, (5) fish meal, (6) sunflower oil, (7) total

3. táblázat

A kísérleti és kontroll takarmányok fehérje és zsírtartalma

	T1	T2	K
Nyerszsír (%) ¹	4,68	4,42	4,5
Nyersfehérje (%) ²	27,03	27,05	27

Table 3 Protein and fat content of control and experimental feeds (1) crude fat, (2) crude protein

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELESÜK

Az egészséges és károsított babbételek fehérjetartalmában a laboratóriumi vizsgálatok különbséget igazoltak a károsított bab javára (1. táblázat). Ez a jelenség szójabab esetében is tapasztalható *Alydidæ* és *Pentatomidæ* kártevők hatására, a fehérjetartalom akár 13%-al is növekedhet (Bae és mtsai, 2014).

Meglepő módon azonban az aminosav-összetétel tekintetében a Spearman-féle korrelációs koeficiens értéke ($r = 0,939$, $p < 0,001$) csaknem teljes megfelelést mutatott az általunk használt tételek esetében (4. táblázat).

A halak növekedését a kontroll és kísérleti tápok etetésének hatására az 1. ábra mutatja. Jól látható, hogy markáns különbség adódott az eltérő csoportok között. A kereskedelmi tápot fogyasztó kontroll csoport dinamikus növekedést produkált, ezzel szemben a babot tartalmazó tápok hatására nem volt tapasztalható lényegi gyarapodás. A károsított babot tartalmazó keveréktakarmány olyan rosszul hasznosult, hogy a halak vesztek a súlyukból a kísérlet végére.

A kísérlet végeztével statisztikailag is igazolható különbséget tapasztaltunk az eltérő csoportok egyedeinek átlagsúlyában, hosszában és kondíciófaktorában is. Legjobb eredményt minden tekintetben a kontroll csoport érte el, a legrosszabbat pedig a zsizsik által károsított babot tartalmazó táp (5. táblázat).

4. táblázat

Az egészséges, valamint károsított bab fehérje összetétele

Aminosav ⁵	Egészséges bab ¹		Károsított bab ²	
	g/100 g minta ³	g/100 g fehérje ⁴	g/100 g minta	g/100 g fehérje
Aszparaginsav ⁶	2,57	12,06	2,58	11,94
Treonin ⁷	1,00	4,69	1,02	4,72
Szerin ⁸	1,30	6,10	1,32	6,11
Glutaminsav ⁹	3,59	16,85	3,72	17,21
Prolin ¹⁰	0,97	4,55	0,97	4,49
Glicin ¹¹	0,89	4,18	0,93	4,30
Alanin ¹²	0,92	4,32	0,94	4,35
Cisztin ¹³	0,29	1,36	0,29	1,34
Valin ¹⁴	1,15	5,40	1,14	5,28
Metionin ¹⁵	0,28	1,31	0,27	1,25
Izoleucin ¹⁶	0,93	4,36	0,93	4,30
Tirozin ¹⁷	0,67	3,14	0,69	3,19
Fenilalanin ¹⁸	1,22	5,73	1,22	5,65
Hisztidin ¹⁹	0,59	2,77	0,60	2,78
Lizin ²⁰	1,54	7,23	1,55	7,17
Ammónia (NH ₃) ²¹	0,38	1,78	0,40	1,85
Arginin ²²	1,36	6,38	1,36	6,29
Összeg ²³	21,31	100,00	21,61	100,00

Table 4 Amino acid composition of intact and damaged beans; (1) intact bean, (2) damaged bean, (3) g 100g⁻¹ sample, (4) g 100g⁻¹ protein, (5) amino acid, (6) asparagine, (7) threonine, (8) serine, (9) glutamic acid, (10) proline, (11) glycine, (12) alanine, (13) cysteine, (14) valine, (15) methionine, (16) isoleucine, (17) tyrosine, (18) phenylalanine, (19) histidine, (20) lysine, (21) ammonia, (22) arginine, (23) total

5. táblázat

Az eltérő táppal etetett halak súlya, hossza és kondíciófaktora a kísérlet végén (átlag ± szórás)

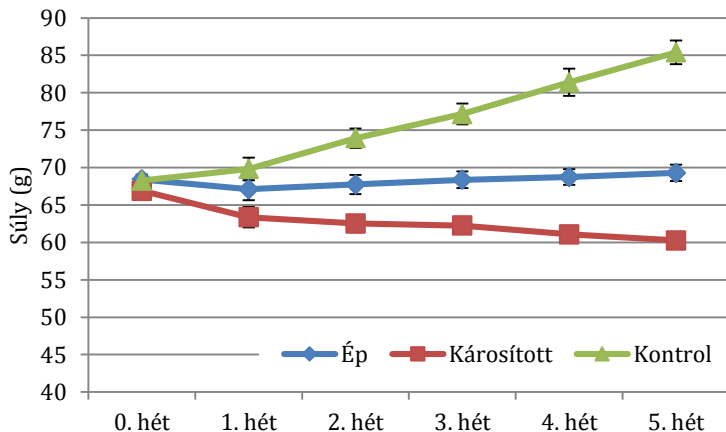
	Ép ¹	Károsított ²	Kontroll ³	P
Élő súly (g) ⁴	69,3 ± 11,0 ^a	60,3 ± 10,7 ^b	85,5 ± 14,2 ^c	<0,01
Testhossz (mm) ⁵	135,6 ± 8,4 ^a	129,7 ± 7,0 ^b	145,7 ± 8,6 ^c	<0,01
Kondíciófaktor ⁶	1,8 ± 0,6 ^a	1,4 ± 0,5 ^a	2,7 ± 0,9 ^b	<0,01

Table 5 Liveweight, bodylength and CF of fish fed different feeds at the end of trial; (1) intact, (2) damaged, (3) control, (4) liveweight, (5) bodylength, (6) condition factor

Az az eredmény, hogy a halliszt ilyen jelentős mennyiségű helyettesítése babbal rontja a ponty teljesítményét, nem meglepő. A legtöbb halfaj negatívan reagál a növényi eredetű fehérjék magas arányára a takarmányban. Pisztráng

esetében a halliszt lóbabbal történő helyettesítése során a 15%-os arány eredményezte a legjobb növekedést (a kontrolhoz képest is), a magasabb százaléku lóbab tartalom már fokozatosan rontotta a teljesítményt (Ouraji és mtsai, 2013). Lóbab fehérje koncentrátum magasabb arányban bekeverve rontotta atlanti lazac (*Salmo salar*) növekedését (De Santis, 2016). Szója helyettesítése kardbabbal (*Canavalia ensiformis*) 11%-os részarány felett szignifikánsan csökkent a afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*) teljesítményét (Solomon és mtsai, 2017).

Valószínűsíthető, hogy az esszenciális aminosavak (lizin, metionin, cisztin) alacsony szintjének limitáló hatása lehet a jelenség oka, mivel a babban mért értékek elmaradnak a ponty számára előírt értékektől (Magyar Takarmánykódex, 1990), egyben a szójában mérhető mennyiségektől is (Cavins és mtsai, 1972). Azonban az a tény, hogy a magasabb fehérjetartalmú károsított bab rosszabb növekedést eredményezett, már elgondolkodtató. Lehetséges magyarázat, hogy a kísérleti tápok összeállítása során az azonos fehérjetartalom kialakítása végett a károsított bab magasabb arányban került bekeverésre az éppel szemben. Az ép babot tartalmazó táp ennek következtében több hallisztet tartalmazott, ami nagyobb hányadban képes biztosítani az esszenciális aminosavakat.



1. ábra. Az eltérő táppal etetett halak növekedése a kísérlet folyamán

Figure 1 Weight gain of fish fed different feeds; ép - intact, károsított - damaged, kontrol - control, súly - weight

Alapvetően a babfélék (bab, lóbab, kardbab, mungóbab), mint növényi eredetű fehérjék 20-30% közötti mennyiségben alkalmazhatók haltápokban ragadozó halak (farkassügér, lazac, szivárványos pisztráng) számára, negatív hatás nélkül (Adamidou, 2008; De Santis és mtsai, 2017; Ouraji és mtsai, 2013). A nílusi tilápia (*Oreochromis niloticus*) növényevőként a 20% feletti lóbabtartalmú tápot is kiválóan képes hasznosítani (Azaza és mtsai, 2009). Borsó és csillagfűrt már jóval nagyobb részarányban (akár 40%) használható pisztrángtáp összetevőjeként, megfelelő növekedést biztosítva (Farhagi és Carter, 2001; Glencross és mtsai, 2004; Collins és mtsai, 2012).

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A kísérlet eredményei arra engednek következtetni, hogy a bab magas arányú halliszt-helyettesítőként való alkalmazása jelentősen rontja a ponty teljesítményét. A bab jól alkalmazható fehérjeforrás a haltakarmányozásban, azonban csak meghatározott mennyiségben váltható ki vele a halliszt. Szükségesnek tartjuk a kísérleti munka folytatását, mely során meg kívánjuk határozni azt a babmennyiséget, mely a haltakarmányban alkalmazva nem rontja a növekedést és a takarmányértékesítést. Fontos lenne még emellett a látszólagos emészthetőség meghatározása és a babtartalmú táp ponty húsmínőségére gyakorolt hatásának vizsgálata is.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatás a Halászati Operatív Program (HOP3_COLL1 1699329032 projekt) támogatásával készült.

IRODALOM

- Adamidou, S. (2008): Effect of extrusion on the nutritional values of peas (*Pisum sativum*), chickpeas (*Cicer arietinum*) and Faba beans (*Vicia faba*) and inclusion in feeds for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and Gilthead seabream (*Sparus aurata*). PhD Thesis. University of Stirling, Scotland
- Azaza, M.S., Wassim, K., Mensi, F., Abdelmouleh, A., Brini, B., Kraiem, M.M., (2009): Evaluation of faba beans (*Vicia faba* L. var. *minuta*) as a replacement for soybean meal in practical diets of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 287: 174–179.
DOI: [10.1016/j.aquaculture.2008.10.007](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.007)
- Bae, S.D., Kim, H.J., Mainali, B.P. (2014): Changes in nutritional composition of soybean seeds caused by feeding of Pentatomid (*Hemiptera*: *Pentatomidae*) and alydid bugs (*Hemiptera*: *Alydidae*). *J. Ecol. Entomol.* 107: 1055-1060. DOI: [10.1603/ec13335](https://doi.org/10.1603/ec13335)
- Cavins, J.F., Kwolek, W.F., Inglett, G.E., Cowan, J.C. (1972): Amino acid analysis of soybean meal: interlaboratory study. *Ass. Offic. Anal. Chem.*

- Collins, S.A., Desai, A.R., Mansfield, G.S., Hill, J.E., Van Kessel, A.G., Drew, M.D. (2012): The effect of increasing inclusion rates of soybean, pea and canola meals and their protein concentrates on the growth of rainbow trout: concepts in diet formulation and experimental design for ingredient evaluation. *Aquaculture* 344-349: 90–99. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2012.02.018](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.02.018)
- De Santis C., Martin S.A.M., Dehler C.E., Iannetta P.P.M., Leeming D., Tocher D.R. (2016): Influence of dietary inclusion of a wet processed faba bean protein isolate on post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 465. 124-133. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2016.09.008](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.09.008)
- Farhangi, M., Carter, C.G. (2001): Growth, physiological and immunological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to different dietary inclusion levels of dehulled lupin (*Lupinus angustifolius*). *Aquac. Res.*, 32, 329–340. DOI: [10.1046/j.1355-557x.2001.00044.x](https://doi.org/10.1046/j.1355-557x.2001.00044.x)
- Glencross, B., Evans, D., Hawkins, W., Jones, B. (2004): Evaluation of dietary inclusion of yellow lupin (*Lupinus luteus*) kernel meal on the growth, feed utilization and tissue histology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 235: 411–422.
DOI: [10.1016/j.aquaculture.2003.09.022](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.09.022)
- IBM SPSS Statistics Version 25 (1989, 2017)
- Krupa, U. (2008): Main nutritional and antinutritional compounds of bean seeds – a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*.58(2): 149-155.
- Magalhaes, S.C.Q., Cabrita, A.R.J., Valentao, P., Andrade, P.B., Rema, P., Maia, M.R.G., Valente, L.M.P., Fonseca, A.J.M. (2016): Apparent digestibility coefficients of European grain legumes in Rainbow trout and Nile tilapia. *Aquacult. Nutr.*, 24: 332-340. DOI: [10.1111/anu.12564](https://doi.org/10.1111/anu.12564)
- Magyar Szabvány (1977): Kémiai vizsgálatok és számítások. Magyar Szabványügyi Hivatal Budapest.
- Magyar Szabvány (1978): Kémiai vizsgálatok és számítások. Magyar Szabványügyi Hivatal Budapest.
- Magyar Szabvány (1981): Kémiai vizsgálatok és számítások. Magyar Szabványügyi Hivatal Budapest.
- Magyar Takarmánycódex (2004): Földművelésügyi Minisztérium Budapest
- Ouraji, H., Zaretabar, A., Rahmani, H. (2013): Performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings fed diets containing different levels of faba bean (*Vicia faba*) meal. *Aquaculture* 416-417: 161-165. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2013.09.013](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.013)
- Sharma, A., Seghal, S. (1992): Effect of processing and cooking on the antinutritional factors of Faba bean (*Vicia faba*). *Food chemistry* 43: 383-385. DOI: [10.1016/0308-8146\(92\)90311-0](https://doi.org/10.1016/0308-8146(92)90311-0)
- Solomon S.G., Okomoda V.T., Oguche O. (2017): Nutritional value of raw *Canavalia ensiformis* and its utilization as partial replacement for soybean meal in the diet of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) fingerlings. *Food Sci. Nutr.*, 6. 207-213. DOI: [10.1002/fsn.3.548](https://doi.org/10.1002/fsn.3.548)
- Varga, D., Horváth, Z. ifj., Bosnyákné, E., H., Kucska B. (2016): Növényi eredetű melléktermékek alkalmazási lehetőségei a tavi pontytakarmányozásban. *Halászat* 109(4): 21-22.
- Yusuf, A., Umar, R., Micah, D.A., Akpotu, J.A. (2016): Growth response and feed utilization of *Clarias gariepinus* juvenile fed graded levels of boiled *Senna obtusifolia* seeds I. seed meal as a replacement for soybean meal. *J. Adv. Vet. Anim. Res.*, 3(4): 345-352.
DOI: [10.5455/javar.2016.c171](https://doi.org/10.5455/javar.2016.c171)



Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on milk production – review on health effects and cow milk characteristics

Mwangi Paul Joseph Mwau, György Bázár, Tamás Tóth*

Kaposvár University, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences,
H-7400 Kaposvár, Guba S. u. 40.

ABSTRACT - The polyunsaturated fatty acids (PUFA) of the n-3 and n-6 group are important in the human body. It is therefore important that these fatty acids are consumed in the right amount and correct proportion so as to maintain a healthy physiological status in the body. Certain foods are naturally rich in these fatty acids, such as sea foods and some oilseeds. Fish and fish oils are rich in eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexanoic acid (DHA) which are n-3 fatty acids, they play a crucial role in improving the physiological and health outcomes in conditions such as cardiovascular diseases, cancer, immune suppression and mental health. These fatty acids have also been shown to play beneficial role during pregnancy and lactation. Linolenic acid (LNA) which is abundant in oilseeds such linseed is a precursor of EPA and DHA in the human and therefore can be converted when need be, however the conversion is not very efficient and therefore cannot be used as a substitute. With the current deteriorating state of the global supply of fish and the high demand of energy causing diversion of resources to produce biofuels, the availability of these natural sources of n-3 and n-6 foods is growing ever scarce. Feeding of full-fat linseed and/or linseed oil has been shown to substantially increase the content of LNA in animal products such as meat, eggs and milk. On the other hand, fish oil supplementation in animal feeds also leads to a substantial increase in EPA and DHA to levels that can positive health effects to the public. Due to this potential to increase the amount of n-3 polyunsaturated fatty acids in animal products, it is seen as a simpler and cheaper way to deliver an increase in consumption to the wider public in a sustainable manner. This is due to the fact that products such as milk and eggs are more widely distributed and available in the market. Some challenges are of course present, such as negative effects due to the oxidative stability of polyunsaturated fatty acids which can have negative effects on rumen function and product organoleptic characteristics. To offset the problem of rumen biohydrogenation of PUFA, various methods of protecting the seed and fish oils have been devised, allowing for feeding even higher doses without impacting negatively on production and product quality.

Keywords: PUFA, fatty acid profile, cow, organoleptic

INTRODUCTION

Milk is recognized as one of the most nutritious food products from animals, because it contains most of the important macro- and micronutrients in adequate amounts essential for human growth and development. The nutrients are also of high nutritive value due to ease of digestion and absorption in the gastrointestinal tract, and hence the reason why it is the food of choice for children since their digestive system is still developing.

*CORRESPONDING AUTHOR

Kaposvár University, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences,
H-7401 Kaposvár, P.O. Box 16.; Tel.: 0036-82-505-800, Fax: 0036-82-320-175;
E-mail: toth.tamas@ke.hu

The global production and consumption of milk and milk products has been on the rise, this has been in part due to an increase in economic growth and income levels especially in the developing and emerging countries. The per capita consumption of animal protein sources such as milk, meat and eggs has tremendously increased in developing countries, driven by income growth and urbanization. The milk consumption in the developing countries almost doubled from 1961-2007, during the same period egg consumption increased five-fold, while meat consumption tripled (FAO, 2013). Cow milk accounts for 83 % of the global milk production, the contribution of other animals is: goats (2.4 %), sheep (1.4 %) and camels (0.3 %), buffaloes are however the most significant source of milk in South Asia accounting for slightly above half of the total milk production at 53 % (FAO, 2013). Taking into account the clear significance of milk as part of diets globally, milk plays an important role in the nutrition and health of a huge population in the world. Recent increase in interest in the role of foods as nutraceuticals has led to research into possibilities of increasing biologically active agents in animal foods, and the greatest effort in animal feed research has been aimed at increasing the content of fatty acids with proven health benefits such as n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA), and conjugated linoleic acid (CLA) (Palmquist, 2009).

The milk fatty acid composition has been shown to be variable depending on the cows' diet, and due to this, opportunity to increase n-3 PUFA in the milk is possible by feeding feeds rich in these fatty acids, such as linseed and fish oils. Oil seed and fish oil (FO) supplementation in dairy cow diets seems to be a promising opportunity for producing dairy products with additional nutritive value, however assurance must be given to the consumers about the potential changes in the organoleptic properties of the product (Lerch *et al.*, 2015).

The aim of this review is to look at the various literature and studies carried out with interest in the supplementation of cows with various sources and combinations of polyunsaturated fatty acids. The paper will focus on the supplementation effects on the milk fatty acid profile, the organoleptic properties of the milk and the health outcomes in the cows, as well.

INTRODUCTION AND NOMENCLATURE OF FATTY ACIDS

Fatty acids (FAs) are long chain monocarboxylic acids (C4-C36), they are the basic building blocks of some important fats. FAs are usually unbranched, have an even number of C atoms, and can either be saturated or un-saturated (contain double bonds). Odd chain acids are usually minor or trace components of

plant and animal lipids, and are more abundant in bacterial lipids (*Gunstone et al.*, 2007). There are over 1000 fatty acids known, with different chain lengths, configuration, position and degree of unsaturation, however only about 20 of them occur widely in nature. Among these FAs, oleic (C18:1 n-9), palmitic (C16:0) and linoleic acids (C18:2 n-6) make up ~80% of all commodity fats and oils (*Gunstone et al.*, 2007).

Fatty acids are named systematically as carboxylic acid derivatives, numbering the chain from the carboxyl carbon (*IUPAC-IUB*, 1978). The -anoic ending of the saturated acid is changed to -enoic, -adienoic, -atrienoic, -atetraenoic, -apentaenoic, and -ahexaenoic to indicate the presence of one to six double bonds, respectively. Systematic names for fatty acids are cumbersome in general use and both shorthand alternatives and trivial names are widely used. The shorthand names use two numbers separated by a colon for the chain length and number of double bonds, respectively, Octadecenoic acid with 18 carbons and one double bond is therefore, 18:1 while the trivial name would be Oleic acid (*Gunstone et al.*, 2007).

Saturated fatty acids

These are FAs that do not contain double bonds in the carbon chain, they are generally even numbered with a general formula: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$. FAs that have 8-12 carbons are generally referred to as medium-chain fatty acids. Due to their specific physiological properties, they are absorbed and catabolized faster than long-chain fatty acids. Furthermore, FAs with 4-12 carbons are not very common and are mainly found in milk, coconut oil and palm oil. These are 4:0 butyric acid, 6:0 caproic acid, 8:0 caprylic acid, 10:0 capric acid, and 12:0 lauric acid (*Leray*, 2012). Long-chain fatty acids have 14 and above carbons, and the most important include, 14:0 myristic acid, 16:0 palmitic acid, and 18:0 stearic acid and are found in practically all vegetable oils and animal fats. 20:0 arachidic acid, 22:0 behenic acid, 24:0 lignoceric acid, and 26:0 cerotic acid are rarely found (*Leray*, 2012).

Unsaturated fatty acids

A wide variety of unsaturated FAs have either an alkenic chain (with one or more double bonds) or an acetylenic chain (with one or more triple bonds). Those with alkenic chains are classified as either monounsaturated (monoene) or polyunsaturated (polyene) (*Leray*, 2012).

Monounsaturated fatty acids

Straight chain, cis isomers of monounsaturated FAs with even number of carbons are a common constituent of many lipids and commodity oils, trans isomers are rare components in natural oils and fats. The most common monounsaturated FA is oleic acid (C18:1), it is found in abundance in most plant and animal lipids and is the major fatty acid in olive oil (70-75 %) and a variety of other nut oils such as macadamia, pistachio, almond, hazel nuts, and pecan contain 50 to over 70 % (*Gunstone et al.*, 2007). Since the elongation of the FA chain is carried out starting from the carboxyl group, the double bonds are counted starting from the final methyl group, this determines the metabolic family, noted by “n-x”, whereby “n” is the number of carbons in the chain and “x” is the position of the last double bond, for example; linoleic acid is named 18:2n-6 because like all FAs of the n-6 family, the last double bond is separated from the final methyl group by six carbons (*Leray*, 2012).

Other examples of monounsaturated FAs myristoleic acid (C14:1 n5), palmitoleic acid (C16:1 n7) found in fish and marine mammal fats, vaccenic acid (C18:1 n7) present in animal fats and butter, physeteric acid (C14:1 n9), discovered in fats of dolphin and whale and in the retinas of mammals, petroselinic acid (C18:1 n12), erucic acid (C22:1 n9), gadoleic acid (C20:1 n11). Trans-isomers of oleic acid are also in existence such as elaidic acid (trans 18:1 n9), and trans vaccenic acid (trans 18:1 n7). The trans vaccenic acid is the most abundant trans FA in dairy products, it is formed as a results of bacterial biohydrogenation in the rumen (*Gunstone et al.*, 2007). Polyunsaturated fatty acids.

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) occur in a variety of structures, they have from two to nine double bonds distributed in various positions along the carbon chain (*Leray*, 2012). Most PUFAs with two or more double bonds occur in a characteristic methylene-interrupted pattern of unsaturation whereby one -CH₂- group is between two cis double bonds, this is due to the action of specific desaturase and chain-elongase enzymes (*Gunstone et al.*, 2007). *Palmquist* (2009) in his review describes, that the double bond position is indicated by the position of the first carbon of the bond, and most naturally occurring PUFAs have the double bond in the cis, cis 1,4 pentadiene structure (multiple double bonds separated by a methylene group). It should be noted that the PUFAs of the n-6 and n-3 series are considered as essential fatty acids (EFA) in human and also to various degrees in all animals (*Palmquist*, 2009). The precursor of the n-6 series, C18:2 n6 linoleic acid, and the precursor of the

n-3 series, C18:3 n3 linolenic acid, are of vegetable origin and are the most essential fatty acids in human (Leray, 2012). The concept of fatty acids that are essential was first described by G. Burr when he showed that some fatty acids had special food value. For instance, in 1929, it was shown that classical skin lesions and symptoms of physiological deficiency including kidney degeneration and death could be reversed by supplementing the diet with lard, reviewed by (Palmquist, 2009). EFA are primarily found in phospholipids at the oil-water interphase, this exhibits the amphiphilic nature of the FAs and the important functional role of phospholipids in membranes. The membrane phospholipids have mainly saturated fatty acids concentrated at the sn-1 position on the glycerol molecule, while the sn-2 position contains mainly long-chain PUFA (Palmquist, 2009). Linoleic acid (C18:2 n6) is present in most plant oils and in high amounts (>50 %) in corn, sunflower, soybean, and safflower oils; γ -linolenic acid (18:3 n3) is abundant in plant oils such as, borage, black-currant, evening primrose, and echium; other n-6 FAs such as arachidonic acid (C20:4), and dihomo- γ -linolenic acid (C20:3 n3) are abundant in animal tissues and act as precursors to biologically active chemicals such as PG2 and PG1 prostaglandins, respectively (Gunstone *et al.*, 2007). α -linolenic acid (C18:3 n3) is an abundant n-3 fatty acid found mainly in plants leaves and seed oils, it is abundant in linseed oil (>50 %), and perilla oil (65 %), chlorophyll lipids in leaves contain 50 % α -linolenic acid; stearidonic acid (C18:4 n3) is a minor component of animal and fish oil and is found in some seed oils; the n-3 PUFAs eicosapentanoic acid (C20:5 n3, EPA) and docosahexanoic acid (C22:6 n3, DHA) have important nutritional significance, and are found mainly in marine fish, shelled fish and fish oils (Gunstone *et al.*, 2007). Evidence in research has shown that long-chain n-3 PUFA have important bioactive properties that are known to reduce risk factors for diseases associated with the cardiovascular system, diabetes and cancer, however, the mechanism through which n-3 FAs affect intermediate metabolism is complex and involves multiple processes (Palmquist, 2009).

IMPORTANCE OF ESSENTIAL FATTY ACIDS IN THE HEALTH OF COWS

The n-3 and n-6 essential fatty acids (EFA) are important for the normal physiological functioning of humans and all domestic animal species. The increased interest in the potential health benefits of these FAs to humans, and the possibility to increase them in animal products through feeding, has led to a renewed interest (Palmquist, 2009). Additionally, research has also shown that the EFA also have beneficial properties to the cow's health and in particular

improve the reproductive performance. EFA are mainly found in phospholipids at the oil-water interphase reflecting the amphiphilic nature of the molecules and the important function that phospholipids play in cell membranes (*Palmquist, 2009*). A study where different dietary levels of fat supplementation (low and high) was given to high producing dairy cows, and the production and development of oocytes were examined showed that high number of small and medium-sized follicles were observed in the low-fat group. However, the high-fat group had a significantly improved blastocyst production and quality from matured and cleaved oocytes (*Fouladi-Nashta et al., 2007*). Additionally, the high dietary fat improved embryo quality through an increase in total and trophoctoderm cell numbers in the blastocysts. During early lactation, high producing dairy cows suffer from a negative energy balance, which also coincides with the period when the next conception should occur as part of management strategy to optimize long-term milk production (*Palmquist, 2009*). Insufficient supply of energy at this time leads to poor reproductive performance characterized by delayed onset of estrous cycle, reduced oocyte quality, which in turn results in low conception rates, high rate of early embryonic death or both (*Fouladi-Nashta et al., 2007*). The same authors reported significant negative effects of milk yield, dry matter intake (DMI), metabolizable energy (ME) intake and starch intake on the production of blastocysts in low-fat diet group (200 g/day), but not in the high-fat diet group (800 g/day). Fat provision cushioned the oocytes from the effects of energy challenges faced by high producing dairy cows leading to improved embryonic development potential.

In their review *Wathes et al. (2007)* indicate that twenty carbon PUFAs are the precursors of a group of physiological active compounds known as eicosanoids which include prostaglandins (PGs), thromboxanes, leukotrienes, and lipoxins. Series-1 PGs are produced from dihomo-gamma-linolenic acid (DGLA), series-2 from arachidonic acid (AA), while series-3 PGs are derived from EPA. It is their view that there is evidence that dietary long-chain PUFAs have the capability to influence the type and amount of PGs produced by various tissues; by acting as substrates for and competitive inhibitors of cyclooxygenation and by altering the cell concentration or expression of various important enzymes. For instance, an increase in n-3 PUFA can reduce total PG synthesis and shift the balance of PGs in the tissue towards the series-3. For successful implantation of the conceptus in the uterus to occur, it must be able to inhibit PG release from the uterus. Pre-implantation mortality of embryos suggests that the embryos are not capable of inhibiting PGF2 α release; leading to continued release causing the Corpus luteum to regress, and termination of

the pregnancy (*Fouladi-Nashta et al.*, 2007). In order for a successful pregnancy to occur in cows, there are suitable conditions that need to be met which include: ovulation of a competent oocyte, insemination at the correct time, and an ideal hormonal balance between estradiol and progesterone during the follicular and luteal phases of the estrous cycle, additionally the embryo will need to develop adequately to prevent luteolysis, and there is evidence that these events can be influenced by dietary PUFAs (*Fouladi-Nashta et al.*, 2007).

EFFECT OF DIETARY FAT SUPPLEMENTATION ON COW MILK FATTY ACID PROFILE

In an experiment carried out using low levels of fish oil (FO) 105 g/day, and 255 g/day of sunflower oil (SO) separately and in combination (255 g/day of SO + 52.5 g/day of FO) supplemented to cows on pasture. The milk concentration of C6:0, C8:0, C12:0 ($P<0.01$), C10:0 and C16:0 ($P<0.001$) decreased, while there was an increased concentration of C18:0 ($P<0.05$), C18:1 trans-9 ($P<0.01$), C18:1 trans-11 ($P<0.001$), C18:2 cis-9, trans-12 ($P<0.001$) and C18:2 cis-9, trans-11 CLA ($P<0.01$) (*Murphy et al.*, 2008). In this study there were differences in sunflower oil and fish oil effect on some fatty acid concentrations, FO led to a greater proportion of C4:0 ($P<0.05$), C18:1 trans-9 and C18:1 trans-11 ($P<0.01$), and C18:2 cis-9, trans-11 CLA ($P<0.05$), while the proportion of C18:0 and C18:3 cis-9, cis-12, cis-15 was greater ($P<0.01$) on SO. Supplementing with a mixture of the two oils compared with offering them separately decreased the concentrations of C4:0 ($P<0.001$) and C6:0 ($P<0.05$) and increased the concentrations of C18:0 ($P<0.01$) and cis-9, trans-11 CLA ($P<0.05$). The results confirmed that the concentration of C18:2 cis-9, trans-11 CLA can be increased further, from an already relatively high concentration in milk from pasture, by offering supplements containing a low level of fish oil either alone or in combination with sunflower oil (*Murphy et al.*, 2008).

Fat supplementation in dairy diets may have adverse effects such as; reduced feed intake, reduction in plasma glucose, and increased body fat mobilization which in turn may have negative health impact on the cow and on milk production (*Juchem et al.*, 2008). To offset the negative impact of increased supplementation of unsaturated fat sources, the use of rumen protected fats such as calcium salts (CaS) of fats has been explored as an alternative. CaS provide a degree of protection from microbial biohydrogenation in the rumen (*Weiss and Wyatt*, 2004), CaS therefore provide a viable technology to reduce the effect on the rumen and to increase intestinal digestibility of FAs, modify the FAs that reach the small intestines and ultimately have an impact on the

milk FA profile (Juchem *et al.*, 2008). Juchem *et al.* (2008) conducted a study to determine the effect of different sources of FAs fed as CaS of fish oil and palm oils (CaSFO) or tallow on the performance of dairy cows. The study was designed to evaluate the effect of dietary EPA and DHA supplementation on lactational performance and milk FA composition. To increase the supply of dietary EPA and DHA to dairy cows while avoiding their potential negative effects on rumen fermentation, those FAs were incorporated into a calcium salt of fish oil combined with palm oil. Both treatment groups received a similar diet with the only difference being the supplemental fat source, which was included in the total mixed ration (TMR) to supply equal amounts of FA from CaSFO or tallow. Cows fed CaSFO had increased proportion of EPA, DHA, cis-9, trans-11 CLA, C18:1 trans-9, and C18:1 trans-11 FA ($P < 0.01$) in milk fat. The results in this experiment showed that feeding of CaSFO altered the milk FA composition, and increased the proportion of EPA and DHA by 13.1 % and 71.4 % respectively.

Kairenius *et al.* (2015) showed results of four multiparous lactating cows feeding grass silage based diet supplemented with fish oil (FO, ultra-refined herring and mackerel oil) at the rate of 0, 75, 150 and 300 g/day. The FO supplementation modified the milk fat composition characterized by a linear decrease in 4-14 carbon saturated fatty acids (SFA), 16:0, 18:0, total SFA, and 18:1 ($P < 0.05$), and a linear or quadratic increase in total 16:1, 16:2, trans 18:1, total 18:2, total CLA, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:6n-3, and total trans FA ($P < 0.05$). There was however no significant effect on milk C18:1, linoleic (C18:2n-6) and linolenic acid (C18:2n-3) proportion ($P > 0.05$).

Fish oil composition is highly variable depending on the fish species, season and geographical variation, ranging from 4 to 32 % for EPA, 2-25 % for DHA, and for other major FAs i.e. C14:0, C16:0, C16:1, C18:1, C20:1, C22:1 (Chilliard *et al.*, 2001). Studies on rumen EPA and DHA hydrogenation both *in vivo* and *in vitro* have given contradictory results, however EPA and DHA seem to undergo hydrogenation to a large extent but less than PUFAs, and EPA is hydrogenated more than DHA (Chilliard *et al.*, 2001). Chilliard *et al.* (2001) observed that a low supply of 50-100 g/day of fish oil led to a decrease in milk fat content, and a mean decrease of milk fat content by 9.1 g/kg was also observed when a daily inclusion rate of 180-145 g of fish oil was made to the diet of dairy cows. There was a slight decrease in the percentage of C4-C14 FA due to a slightly higher decrease in these FA proportional to the total fat secretion. More marked decrease was seen when milk fat content was sharply decreased (more than 10 g/day). Furthermore, in almost all trials reviewed there was a very large increase in the percentage of trans-C18:1 and to a lower extent in the percentage

of trans-C16:1. The increase in trans-C18:1 percentage mainly due (for 74–82 %) to the trans-11 isomer together with small increases in trans-6, trans-9, trans-10 and -11 C18:1 isomers. The milk CLA content increased sharply from 0.2-0.6 % in control diets to 1.5-2.7 % in supplemented diet, with as little supplementation as 200-300 g/day of marine oil. The increase was almost exclusively due to rumenic acid cis-9, trans-11 CLA (Chilliard *et al.*, 2001). Marine oils have been extensively studied due to the potential health benefits by increasing n-3 FA and CLA concentration in milk and reduction in the milk fat content, they sharply decrease fat content, and almost all milk FAs particularly oleic, palmitic and stearic acids. On the other hand they increase secretion of trans-C18:1, CLA, EPA, DHA, however the transfer efficiency to milk of EPA and DHA is very low at less than 3-5% (Chilliard *et al.*, 2001).

In an 8-week trial (AbuGhazaleh and Holmes, 2007) fish oil and sunflower oil were added to the diet of partially grazing Holstein cows. The amount of supplementation was 100 g/day FO and 300 g/day of SFO, in this study the milk production, milk fat percentage, milk fat yield and milk protein yield were not affected by the dietary treatments. The proportion of cis-9, trans-11 CLA and vaccenic acid in milk fat were significantly higher for cows fed the oil-supplemented diet over the 8 weeks of oil supplementation. Trans-11 18:1 (vaccenic acid, VA), is a precursor of the biohydrogenation of both linoleic and linolenic acid in the rumen, in the tissues VA can be converted to cis-9, trans-11 CLA by the action of the Δ^9 -desaturase enzyme (AbuGhazaleh and Holmes, 2007). Supplementation of fish oil and sunflower oil separately led to significant increase in milk CLA content, however studies have shown that a blend of fish oil and extruded sunflower oil was more efficient in the enhancement of VA and cis-9 trans-11 CLA than when fed separately (Whitlock, 2002). In another study where a combination of fish oil with other oil sources which were high in either stearic acid (rumo-fat 64.2 % stearic acid), oleic acid (sunflower seeds 83.9 % oleic acid), linolenic acid (flax seeds 50.1 % linolenic acid), or linoleic acid (sunflower seeds 60 % linoleic acid); the study concluded that feeding a high linoleic acid fat source with fish oil most effectively increased proportion and yields of milk cis-9, trans-11 CLA and VA (Kalscheur, 2003).

Ferlay *et al.* (2013) reported that the FA composition was influenced by increasing the amount of linseed in the diet, the SFA decreased ($p < 0.001$) linearly with increased amounts of extruded linseed inclusion in the diet (0-15 %). On the other hand, the milk MUFA, PUFA, and total trans FAs increased linearly ($p < 0.001$), there was also a linear increase in the total n-3 FAs ($p < 0.001$) and a reduction in the n-6:n-3 ratio in a linear manner as well. The percentage of cis-9 trans-11 CLA increased ($p < 0.05$) in both a linear and quadratic manner,

whereby the highest value was reached when extruded linseed was at 10 %, then decreasing between 10 and 15 %. The authors concluded that extruded linseed supplementation can alter the FA composition of milk, with an increase in potentially beneficial n-3 FAs, cis-9 trans-11 CLA and a decrease in SFA. Extruded linseed also led to an increase in milk trans FAs percentage. Increasing extruded linseed by 2.1 % and 4.3 % respectively in two experimental diets of Holstein cows on a total mixed ration diet based on corn silage and concentrates led to a linear decrease in saturated fatty acids (C6-C14), and palmitic acid (C16:0). Increasing linseed dose led to an increase in the quantity of total polyunsaturated FAs, particularly C18:3 (three-fold increase). In contrast, quantity of C18:2 decreased, whereas quantity of cis-9 trans-11 CLA increased only with the 2.1 % extruded linseed treatment (*Hurtaud et al., 2010*).

EFFECT OF FAT SUPPLEMENTATION ON THE ORGANOLEPTIC PROPERTIES OF MILK

The supplementation of dairy cow diets with fats with a high percentage of PUFA has been shown to be an effective way of enriching milk with these FAs. However, with an increase in PUFA the risk of milk spoilage due to oxidation must be put into consideration, it is also necessary to be aware of the consumer preferences in terms of the organoleptic changes that may occur due to these supplementations. Therefore, to assure consumer acceptance of the milk and milk products, knowledge of the effects of fish oils and seed oils addition to dairy diets on the sensorial properties of the milk and its products is required (*Lerch et al., 2015*).

Lerch et al. (2015) examined the effect of extruded linseed supplementation (5 % of additional fat to DMI) to dairy cows on a diet based on corn silage, on the sensorial properties of milk and cheese. In their study, there was no effect ($P>0.10$) on the sensorial properties of the bulk raw milk when assessed by descriptive tests. All the scores for off-flavor and odors (metallic taste, fishy odor and flavor) relative to lipolysis and oxidation remained undetected by the panel and were unaffected by extruded linseed, even when analyzed with triangular test, the trained panelists did not detect difference between the control and the supplemented group ($P>0.10$). Additionally, in another study where linseed oil at 3 % of additional oil in DMI was supplemented in a concentrate or grass silage based diets had no effect on the organoleptic properties (*Saliba et al., 2014*). *Hurtaud et al. (2010)* observed no significant effect in the sensorial properties (color, smell, and flavor) of butter produced from milk, when they supplemented the diet of dairy cows with increasing amounts

of extruded linseed (2.1 % and 4.3 % of the ration on a dry matter basis).

Cows were fed a supplement of calcium salts of palm and fish oil (2.7 % CaPFO), alone or in combination with extruded full-fat soy beans (5 % ESB) or soy bean oil (0.7% SO) in a trial by *Allred et al.* (2006). They observed that milk had a significant enhancement of CLA, VA and total n-3 FA in all the diet combinations. However, a trained sensory panel did not observe any off flavors in milk from all treatments, and the overall quality was the same. The same research observed some oxidized flavor when experimental milk was used to prepare cheese especially for CaPFO + SO combined group. In a separate study where 2 % soybean oil and 1 % fish oil were supplemented to cows, the milk was then standardized to 2 % fat, pasteurized, homogenized and stored in plastic containers at 4 °C, oxidation was also induced by exposing half of the container to light (*Lynch et al.*, 2005). Testing was conducted at 1, 7, and 14 days post pasteurization using triangle tests by untrained panelists. Although the levels of VA, cis-9 trans-11 CLA and degree of FA unsaturation were significantly elevated, the sensory evaluation indicated that the panelists found no flavor differences between the experimental milks and the control. Furthermore, there was no difference in the susceptibility to development of oxidized off flavors between the control and experimental milks even when oxidation was induced through exposure to light.

Forty-nine early-lactation Holstein Friesian cows were fed total mixed rations containing 0 (control) or 45 g/kg (on dry matter basis) of a mixture (1:2 wt/wt) of fish oil and sunflower oil during two consecutive 7-day periods to produce a control and CLA-enhanced milk, respectively (*Jones et al.*, 2005), in this study the control and experimental milks were used to produce ultra-heat treated milk (UHT), butter and cheese. The organoleptic properties of the produced products were analyzed by an experienced test panel using a triangle test. The study observed there was a significant difference between the experimental UHT milk and the control milk (23 out of 36 observations correctly identified the different milk samples), the control and experimental butters stored at 8 °C were also found to be significantly different. However, no off flavors or rancidity was detected by any of the panelists.

CONCLUSIONS

Intake of n-3 fatty acids is shown to be important for the normal physiological functioning of dairy cows, especially with regard to reproductive health which has the potential of increasing the productivity and longevity of the cow. Furthermore, consumption of adequate amounts of n-3 FAs through intake of fish oil FAs is not sustainable due to diminishing fish resources. However, there is

potential to increase the amounts of n-3 FAs in milk and other animal products hence presenting an opportunity for increased intake of the beneficial FAs in population. It is important to be cognizant of the negative implication of feeding high amounts of PUFAs in dairy cow diets, and importantly to put into consideration the organoleptic changes that would occur and their impact on consumer acceptability of the end product.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors would like to express their sincere gratitude to the Ministry of Agriculture of Hungary (MoAH) and the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) for supporting this study by awarding the FAO-Hungarian Government Scholarship to author P. Mwau.

REFERENCES

- AbuGhazaleh, A.A., Holmes, L.D. (2007) Diet supplementation with fish oil and sunflower oil to increase conjugated linoleic acid levels in milk fat of partially grazing dairy cows. *J Dairy Sci*, 90(6). 2897-2904. DOI: [10.3168/jds.2006-684](https://doi.org/10.3168/jds.2006-684)
- Allred, S.L., Dhiman, T.R., Brennand, C.P., Khanal, R.C., McMahon, D.J., Luchini, N.D. (2006) Milk and cheese from cows fed calcium salts of palm and fish oil alone or in combination with soybean products. *J Dairy Sci*, 89(1). 234-248. DOI: [10.3168/jds.s0022-0302\(06\)72088-4](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(06)72088-4)
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Doreau, M. (2001) Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cows diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livestock Prod Sci*, 70(1-2). 31-48. DOI: [10.1016/s0301-6226\(01\)00196-8](https://doi.org/10.1016/s0301-6226(01)00196-8)
- FAO. (2013). Milk and dairy products in human nutrition. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/018/i3396e/i3396e.pdf>
- Ferlay, A., Doreau, M., Martin, C., Chilliard, Y. (2013) Effects of incremental amounts of extruded linseed on the milk fatty acid composition of dairy cows receiving hay or corn silage. *J Dairy Sci*, 96(10). 6577-6595. DOI: [10.3168/jds.2013-6562](https://doi.org/10.3168/jds.2013-6562)
- Fouladi-Nashta, A.A., Gutierrez, C.G., Gong, J.G., Garnsworthy, P.C., Webb, R. (2007) Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. *Biology Reprod*, 77(1). 9-17. DOI: [10.1095/biolreprod.106.058578](https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.058578)
- Gunstone, F.D., Harwood, J.L., Dijkstra, A.J. (2007) *The Lipid Handbook*. CRC Press, Taylor & Francis Group, New York, USA, pp. 791.
- Hurtaud, C., Faucon, F., Couvreur, S., Peyraud, J. (2010) Linear relationship between increasing amounts of extruded linseed in dairy cow diet and milk fatty acid composition and butter properties. *J Dairy Sci*, 93(4). 1429-1443. DOI: [10.3168/jds.2009-2839](https://doi.org/10.3168/jds.2009-2839)
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1978) The nomenclature of lipids. *J Lipid Research*, 19. 114-128. <http://www.jlr.org/content/19/1/114.full.pdf+html>
- Jones, E.L., Shingfield, K.J., Kohen, C., Jones, A.K., Lupoli, B., Grandison, A.S., Beever, D.E., Williams, C.M., Calder, P.C., Yaqoob, P. (2005) Chemical, physical, and sensory properties of dairy products enriched with conjugated linoleic acid. *J Dairy Sci*, 88(8). 2923-2937. DOI: [10.3168/jds.s0022-0302\(05\)72973-8](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(05)72973-8)
- Juchem, S.O., Santos, J.E.P., Cerri, R.L.A., Chebel, R.C., Galvão, K.N., Bruno, R., DePeters, E.J., Scott, T., Thatcher, W.W., Luchini, D. (2008) Effect of calcium salts of fish and palm oils on lactational performance of Holstein cows. *Anim Feed Sci Technol*, 140(1-2). 18-38.

- DOI: [10.1016/j.anifeedsci.2007.01.018](https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.01.018)
Kairenius, P., Ärölä, A., Leskinen, H., Toivonen, V., Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., Huhtanen, P., Hurme, T., Griinari, J.M., Shingfield, K.J. (2015) Dietary fish oil supplements depress milk fat yield and alter milk fatty acid composition in lactating cows fed grass silage-based diets. *J Dairy Sci*, 98(8). 5653-5671. DOI: [10.3168/jds.2015-9548](https://doi.org/10.3168/jds.2015-9548)
- Kalscheur, K.F. (2003) Milk conjugated linoleic acid response to fish oil supplementation of diets differing in fatty acid profiles. *J Dairy Sci*, 86(3). 944-953.
DOI: [10.3168/jds.s0022-0302\(03\)73677-7](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(03)73677-7)
- Leray, C. (2012) *Introduction to Lipidomics: From Bacteria to Man*. CRC Press, Taylor & Francis Group, New York, USA, pp. 332.
- Lerch, S., Ferlay, A., Graulet, B., Cirié, C., Verdier-Metz, I., Montel, M.C., Chilliard, Y., Martin, B. (2015) Extruded linseeds, vitamin E and plant extracts in corn silage-based diets of dairy cows: Effects on sensory properties of raw milk and uncooked pressed cheese. *Int Dairy J*, 51. 65-74. DOI: [10.1016/j.idairyj.2015.07.006](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.07.006)
- Lynch, J.M., Lock, A.L., Dwyer, D.A., Noorbakhsh, R., Barbano, D.M., Bauman, D.E. (2005) Flavor and stability of pasteurized milk with elevated levels of conjugated linoleic acid and vaccenic acid. *J Dairy Sci*, 88(2). 489-498. DOI: [10.3168/jds.s0022-0302\(05\)72711-9](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(05)72711-9)
- Murphy, J.J., Coakley, M., Stanton, C. (2008) Supplementation of dairy cows with a fish oil containing supplement and sunflower oil to increase the CLA content of milk produced at pasture. *Livestock Sci*, 116(1-3). 332-337. DOI: [10.1016/j.livsci.2008.02.003](https://doi.org/10.1016/j.livsci.2008.02.003)
- Palmquist, D.L. (2009) Omega-3 fatty acids in metabolism, health, and nutrition and for modified animal products foods. *Professional Anim Scientist*, 25(3). 207-249.
DOI: [10.15232/s1080-7446\(15\)30713-0](https://doi.org/10.15232/s1080-7446(15)30713-0)
- Saliba, L., Gervais, R., Lebeuf, Y., Vuilleumard, J.C., Fortin, J., Chouinard, P.Y. (2014) Effect of feeding linseed oil in diets differing in forage to concentrate ratio: 2. Milk lactone profile. *J Dairy Research*, 81(1). 91-97. DOI: [10.1017/s0022029913000708](https://doi.org/10.1017/s0022029913000708)
- Wathes, D.C., Abayasekara, D.R.E., Aitken, R.J. (2007) Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biology Reprod*, 77(2). 190-201.
DOI: [10.1095/biolreprod.107.060558](https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.060558)
- Weiss, W.P., Wyatt, D.J. (2004) Digestible energy values of diets with different fat supplements when fed to lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 87(5). 1446-1454.
DOI: [10.3168/jds.s0022-0302\(04\)73295-6](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(04)73295-6)
- Whitlock, L.A. (2002) Feeding fish meal and extruded soybeans enhances the conjugated linoleic acid (CLA) content of milk. *J Dairy Sci*, 85(3). 624-631.
DOI: [10.3168/jds.s0022-0302\(02\)74116-7](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(02)74116-7)



Táblaszegélyek szerepének vizsgálata a kisemlősök művelt területekre történő terjedésében

Bóti Szilvia*, Heltai Miklós, Márton Mihály

Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Vadvilág Megőrzési Intézet,
2100 Gödöllő, Páter Károly utca 1.

ABSTRACT - Study on the role of agricultural field edges in case the back spreading of small mammals in cultivated areas

Author(s): Szilvia Bóti, Miklós Heltai, Mihály Márton

Affiliation(s): Szent István University, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, Institute for Wildlife Conservation, H-2100 Páter Károly Street 1. Gödöllő, Hungary.

Rodents are important and common pests in the agricultural landscapes. During periodic gradations the small mammals cause considerable damages on both agricultural and forestry areas. The edges of agricultural fields could be the basis of gradation. The aim of our study we have looked for the answer that the edges which are different in type could be play a significant role in case the small mammals aggregation, and their back spreading in cultivated areas. The study areas are located in the north-western part of Jász-Nagykun-Szolnok county, in the outer area of Jászfényszaru. The study was carried out between 28 February and 30 October 2016. In the first study area zero or few small mammal holes can be found. In case of edge the spatial pattern was primarily characterized by higher hole density in woody vegetation. In the second study area the hole density of small mammals showed different results in the table and in the edge, presumably due to the enrichment of the food supply and the disturbance (ploughing) of soil. In February in the first study area the habitat selection of small mammals was shown. They preferred the edge and avoided the arable stripe groups. In August in the second study area the small mammals have selected significantly between the stripe groups. They avoided the edge and preferred the middle of the field. The role of edge in the dispersion of small mammals to the agricultural area was not proved in the first study area, while in the second study area we received periodically different results.

Keywords: small mammals, dispersion, edge, preference

ÖSSZEFOGLALÁS

Az agrárökoszisztémákban közönséges rágcsálók a globális kártevők egyik legfontosabb csoportját képezik. Ezek a kisemlősök az időszakos gradációk alkalmával jelentős károkat okozhatnak a mezőgazdasági, és az erdészeti területeken. A gradáció kialakulását segíthetik a mezőgazdasági táblákat övező szegélyterületek is. Vizsgálatunkkal arra kerestünk választ, hogy van-e kimutatható szerepe a különböző típusú szegélyeknek a kisemlősök aggregálódásában, valamint azok művelt területekre történő

*CORRESPONDING AUTHOR

Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Vadvilág Megőrzési Intézet
2100 Gödöllő, Páter Károly utca 1.
E-mail: boti.szilvia@gmail.com

viSSzaterjedésében. A vizsgálati területek Jász-Nagykun-Szolnok megye északnyugati részén, Jászfényszaru külterületén helyezkednek el. A felmérések 2016. február 28-tól október 30-ig történtek. Az első vizsgálati területen a táblán belül a felmérések alkalmával nulla vagy legfeljebb egy-két kisémlős lyuk volt fellelhető. A szegélyen belül a térbeli mintázatot elsősorban a fás szárú vegetációval rendelkező szegélyek magasabb lyuksűrűsége jellemezte. A második mintaterületen a kisémlős lyuksűrűség felmérésenként eltérő képet mutatott a szegélyben és a táblában, melyet feltehetően a táplálékkészlet feldúsulása és a talajbolygatás befolyásolt. A kisémlősök élőhelyválasztását az első vizsgálati területen február végén a szegély kifejezett preferenciája és a táblán belüli sáv csoportok erős elkerülése jellemezte. A második vizsgálati területen augusztusban volt kimutatható a kisémlősök válogatása a sáv csoportok között, a szegélyt elkerülték, míg a tábla közepét preferálták. A szegély szerepe a kisémlősök mezőgazdasági táblára történő terjedésében az első vizsgálati területen nem nyert bizonyítást, míg a második vizsgálati területen az időszakosan eltérő eredmények nem zárták ki a szegélyek terjedésben betöltött szerepét.

(*Kulcsszavak:* kisémlősök, terjedés, szegély, preferencia)

BEVEZETÉS

A mezőgazdasági termelés célja a szükséges termékeket megfelelő minőségben, állapotban és mennyiségben, alkalmas helyen és időben, költséghatékonyan rendelkezésre bocsátani (*Kosztka 2010*). A nagyüzemi mezőgazdaságban a minél nagyobb terméshozamok alacsony fajlagos költségek mellett a legegyszerűbben nagy és homogén táblák kialakításával érhetőek el (*Heltai 2014*). A mezőgazdaság intenzívebbé válása kedvez a jól alkalmazkodó, generalista fajoknak, míg a ritka és veszélyeztetett fajok gyakoribbak a hagyományos (kisparcellás, extenzív) mezőgazdasági ökoszisztémákban (*De la Pena et al. 2003*). A mezőgazdasági rendszerben a termelés hatékonyságára kockázatot jelentenek a különböző mezőgazdasági károk. Az agrárökoszisztémákban közönséges rágcsálók a globális kártevők egyik legfontosabb csoportját képezik (*Jacob 2003, Stenseth et al. 2003*). Világszerte körülbelül 1700 rágcsáló fajt ismerünk, de csak 5-10%-uk okoz jelentős károkat a mezőgazdasági környezetben (*Stenseth et al. 2003*). A növénytermesztésben főként a mezei pocok (*Microtus arvalis*) jelenik meg károsítóként (*Ivány et al. 1994, Aschwanden et al. 2007, Radics 2010*). A

gradáció kialakulását segíthetik a mezőgazdasági táblákat övező szegélyterületek is. Mivel a szegélyek jelentősége a különböző gazdasági ágazatok számára más és más (pl. kártevő és gyom rezervoár, fészkelő- és táplálkozóhely, biodiverzitás megőrzése), így annak kezelése esetenként teljes mértékben ellentétes lehet, amely számos konfliktushelyzetnek ad teret (*Pinke 1999, Ángyán és Menyhért 2004, Faragó 2006*).

Nem tisztázott, hogy a szegély, mint élőhely, milyen mértékben határozza meg a kisemlősök gyakoriságát, illetve szétszóródását, terjedését egy adott területen. A tudásanyag bővítésével a rágcsálók elleni mezőgazdasági védekezés célzottabbá tehető, az időben és térben pontosabb kezelés következtében a haszon-ráfordítás mérleg kiegyenlítettebb lehet.

Tanulmányunkban vizsgáltuk, hogy van-e kimutatható szerepe a különböző típusú szegélyeknek a kisemlősök aggregálódásában, valamint azok művelt területekre történő visszaterjedésében.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálati területek Jász-Nagykun-Szolnok megye északnyugati részén, Jászfényszaru külterületén helyezkednek el.

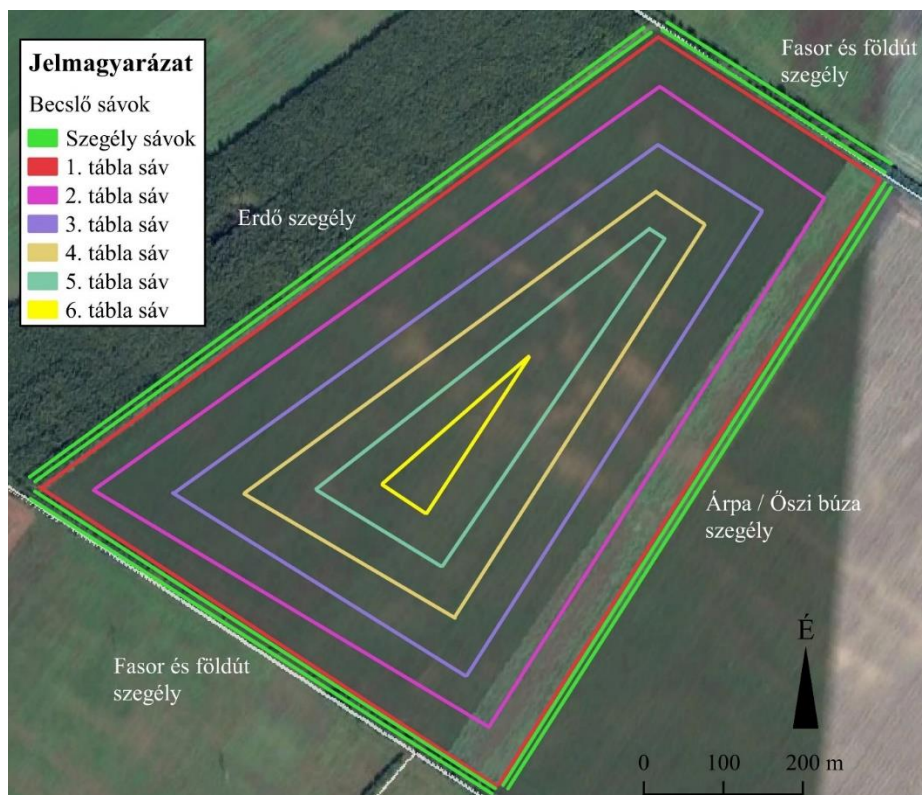
Az első vizsgálati terület 46,7 hektár kiterjedésű, északi és déli oldalát akácos fasort követően földút, nyugati oldalát földutat követően akác-nyár erdő, keleti oldalát mezőgazdasági terület határolja (1. ábra). A vizsgálat ideje alatt a keleti oldalánál árpa (*Hordeum vulgare*), majd őszi búza (*Triticum aestivum*) alkotta a vegetációt. A vizsgálati terület táblájában a vizsgálati időszakban őszi káposztarepcét (*Brassica napus*) termesztettek, majd 2016 őszen búza került a táblába. A földhasználó elmondása alapján a területet 2013-ban járatkezelték mezei pocok ellen.

A második vizsgálati terület 2,8 hektár kiterjedésű, északi oldalát földút, azt követően füves sáv, déli, nyugati és keleti oldalát mezőgazdasági tábla határolja. A vizsgálat ideje alatt a déli oldalánál búza, majd gabonavetés, a nyugati oldalánál rövidebb ideig kukorica (*Zea mays*), majd szántás volt. A keleti oldalon délről indulva kisebb szakaszon (11 m-en) gyeper, 92 m-en rozs (*Secale cereale*), 120 m-en többéves lucerna (*Medicago sativa*), 85 m-en szántás, majd 2016 szeptemberétől lucerna, 12 m-en keresztül pedig kukorica volt (2. ábra). A vizsgálati terület táblájában őszi búzát termesztettek, majd a betakarítását követően a területet felszántották.

A kisémlős állománysűrűség felmérését és monitorozását lyuksűrűség becsléssel végeztük (*Lisická et al. 2007, Márton és Heltai 2015*). Az adatgyűjtés az első vizsgálati területen négy alkalommal történt (2016. február 28., április 02-03., július 07-08., október 30.). A júliusi mérésnél csak a tábla került felmérésre, a szegély a magas lágyszárú vegetáció sűrű borítása következtében nem. A második vizsgálati területen öt alkalommal történt adatgyűjtés (2016. március 12., április 03., május 09., augusztus 13., október 30.). A két mintavételi terület külön-külön került elemzésre, összehasonlításuk nem volt lehetséges.

A kisémlős lyukak felvételezése sávos becsléssel történt, egy-egy sáv szélessége 2 méter volt (*Márton et al. 2014*). A sávokat 50 méteres szakaszokra osztottuk (ettől rövidebbek csak a sávok végén elhelyezkedő szakaszok voltak). A szegélyekben két-két, oldalanként elkülönülő sáv, míg a táblák belsejében az első vizsgálati területen hat, a második vizsgálati területen öt, az oldalakkal párhuzamosan futó, egybefüggő, a tábla alakját követő sáv helyezkedett el. A sávok egymáshoz képest a szegélyekben 5 méterre, a táblákban az eltérő alak és méret miatt az első mintaterületen 50 méterre, a második mintaterületen 10 méterre húzódtak.

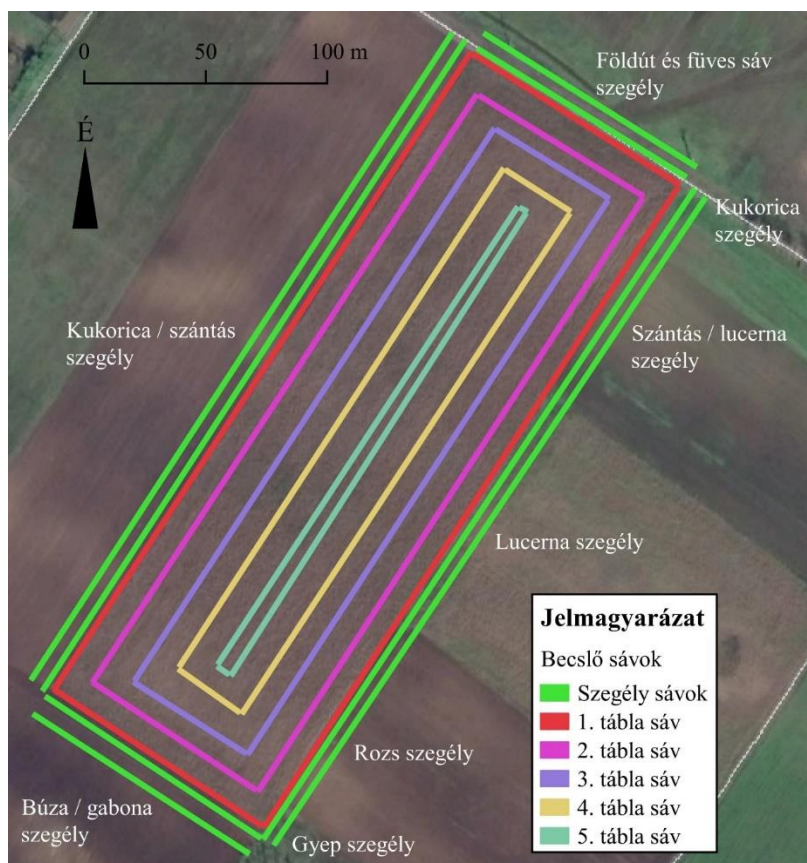
A statisztikai értékelés alapegységét adó kisémlős lyuksűrűséget db/100 m² mértékegységben adtuk meg. Az első vizsgálati területen a szegélyeket, valamint az 1-es és 2-es, 3-as és 4-es, 5-ös és 6-os tábla sávokat egyben kezeltük, így alakult ki négy csoport, melyeket a következő jelölésekkel láttuk el: szegély (szegélysávok), tábla szél (1-es, 2-es sáv), tábla közép (3-as, 4-es sáv) és tábla belső (5-ös, 6-os sáv). A második vizsgálati területen is négy csoportot alakítottunk ki: szegélyt (szegélysávok), tábla szélt (1-es és 2-es sáv), tábla közepet (3-as és 4-es sáv) és tábla belsőt (5-ös sáv). Az adatsorokon belül a normál eloszlás teszteléséhez Kolmogorov-Smirnov tesztet alkalmaztunk (*Reiczigel et al. 2010*). A térbeli elemzést (egyes sávok lyuksűrűségének egymáshoz viszonyítását) mérésenként Kruskal-Wallis tesztel, és Dunn-féle post hoc próbával végeztük. Az időbeli változás vizsgálatához (ugyanazon sávok lyuksűrűségének mérésenkénti összevetéséhez) Friedman tesztet és Dunn-féle post hoc próbát alkalmaztunk (*Reiczigel et al. 2010*).



1. ábra. Az első vizsgálati terület szegélyeinek és becslő sávjainak áttekintő ábrázolása

Figure 1: Overview of estimation stripes and edges in case of the first study area

A kisemlősök élőhelyválasztásának vizsgálata során a válogatást kétféle módon teszteltük. Első esetben a megtalált kisemlős lyukak eloszlását a fentebb ismertetett sávcsoporthoz területi aránya alapján várható eloszlással vetettük össze. A második esetben a megtalált kisemlős lyukak eloszlását a Quantum GIS 2.18.2 térinformatikai programban generált véletlen pontok eloszlásával hasonlítottuk össze. A véletlen pontok elemszáma megegyezett az adatgyűjtés során feljegyzett kisemlős lyukak számával. Utóbbi módszert öt alkalommal ismételtük.



2. ábra. A második vizsgálati terület szegélyeinek és becő sávjainak áttekintő ábrázolása

Figure 2: Overview of estimation stripes and edges in case of the second study area

Az első mintaterületen a február végi eredmények tették lehetővé a számítás elvégzését, míg a második mintaterületen a március eleji és az augusztusi mérés. Ennek oka az év későbbi szakaszában fellépő vegetációs torzítás, valamint a talajbolygatás volt. Az eloszlásokat Fisher-féle egzakt próbával teszteltük (Fisher 1922). Továbbá a véletlen eloszlások esetében Bonferroni Z-teszttel sávcsopontonként elemeztük az eloszlásban való eltérést (Byers et al.

1984). A válogatás tesztelését követően az élőhelypreferenciát Bonferroni Z-teszttel és Jacobs-indexszel (Jacobs 1974) számítottuk ki.

A terjedés tesztelése a mintaszám és a lyukak területi eloszlásának függvényében kizárólag a második vizsgálati területen a márciusi és az augusztusi méréseknél volt lehetséges, melyet Fisher-féle egzakt próbával vizsgáltunk (Fisher 1922). Az elemzés alapját az összes oldalankénti kisemlős lyuk darabszám adta.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELES

Első vizsgálati terület

Az első vizsgálati területen a táblán belül a mérések alkalmával nulla vagy legfeljebb egy-két kisemlős lyuk volt fellelhető, a szegély azonban már változatosabb képet mutatott (1. táblázat).

1. táblázat

Az első vizsgálati terület felméréseinek leíró statisztikai eredményei (Jászfényszaru)

Első vizsgálati terület ¹		Lyuksűrűség (db/100 m ²) ²				Összes talált lyukak száma ⁷
		Átlag ³	Szórás ⁴	Minimum érték ⁵	Maximum érték ⁶	
Február ⁸	Sz	1,97	3,80	0	26	226
	T	0,01	0,20	0	3	3
Április ⁹	Sz	0,35	0,98	0	6	40
	T	0,00	0,07	0	1	1
Július ¹⁰	Sz	-	-	-	-	-
	T	0,02	0,17	0	2,38	2
Október ¹¹	Sz	0,56	1,23	0	6,25	63
	T	0,00	0,00	0	0	0

Megjegyzés: Sz= szegély, T= tábla

Table 1: Descriptive statistical results based on the measurement of the first study area (Jászfényszaru) The first study area(1), Hole density (piece/100 m²)(2), Average(3), Standard deviation(4), Minimum value(5), Maximum value(6), The total number of holes(7), February(8), April(9), July(10), October(11); Note: Sz= edge, T= field

A szegélyen belül a mérések átlagában a legnagyobb lyuksűrűség a fás útszéleken, és az erdő északi felében volt megfigyelhető, a legkisebb sűrűség érték pedig az árpa tábla szegélyénél. A február és október végi méréseknél a szegélyben a gócpontok megközelítőleg ugyanott helyezkedtek el. Az októberi

mérésnél lényegesen kevesebb kisemlős lyukat észleltünk, mint a februári mérés alkalmával, amihez hozzájárult az őszi magas vegetáció is, mely a megfigyelési valószínűségek feltehető eltérését okozta.

Az áprilisi mérésnél a szegélyben a magas lágyszárú növényzet miatt rossz észlelési viszonyok voltak, ezért a júliusi mérésnél a szegély már nem került felmérésre. Áprilisban a táblában csak 1 db lyuk került feljegyzésre, júliusban összesen 2 db, az is a tábla széleken.

Térben elemezve a vizsgálati területet, az első (februári) mérés alkalmával a Kruskal-Wallis teszt és a Dunn-féle post hoc próba szignifikáns különbséget ($KW=110,02$; $p<0,001$; $n=347$) mutatott a szegély és a tábla szél (Dunn próba: $p<0,001$), a szegély és a tábla közép (Dunn próba: $p<0,001$), valamint a szegély és a tábla belső (Dunn próba: $p<0,001$) között. Április elején szintén ezt az eredményt tapasztaltuk ($KW=38,9$; $p<0,001$; $n=347$; Dunn próba: szegély-tábla szél $p<0,001$, szegély-tábla közép $p<0,001$, szegély-tábla belső $p<0,001$). Július elején nem volt szignifikáns különbség a tábla sávok között ($KW=2,101$; $p=0,350$; $n=223$), a szegélyt ekkor nem lehetett felmérni. Az október végi mérésnél ismét jelentős eltérést ($KW=64,65$; $p<0,001$; $n=347$) mutatott a szegély és a tábla szél (Dunn próba: $p<0,001$), a szegély és a tábla közép (Dunn próba: $p<0,001$), illetve a szegély és a tábla belső (Dunn próba: $p<0,001$) is.

Az egyes mérési időpontok eredményeit összevetve a szegélynél szignifikáns különbség jelentkezett a februári és az áprilisi mérés ($Fr=44,274$; $p<0,0001$; $n=348$; Dunn próba: $p<0,001$), illetve a februári és az októberi mérés (Dunn próba: $p<0,01$) alkalmával. A tábla szél ($Fr=3,667$; $p=0,300$; $n=436$) és a tábla közép ($Fr=3$; $p=0,392$; $n=304$) időben vizsgálva sem mutatott eltérést. A tábla belsőben egyik mérés alkalmával sem találtunk kisemlős lyukat, így a Friedman tesztet és a Dunn-féle post hoc próbát nem lehetett rá elvégezni.

Második vizsgálati terület

A második vizsgálati területen a szegélyben és a táblában is változó sűrűséggel fordult elő kisemlős lyuk, melyet mérésenként az átlagos lyuksűrűség fluktuációja is mutat (2. táblázat).

Három szegélynél nem találtunk kisemlős lyukat a mérések alkalmával, ezek a szomszédos búza- és a kukoricatáblákkal érintkező, valamint a földút menti szegélyek.

A március eleji felmérésnél még koncentráltan fordultak elő a kisemlős lyukak, a legnagyobb sűrűség a gyp szegélyében volt.

2. táblázat

A második vizsgálati terület felméréseinek leíró statisztikai eredményei (Jászfényszaru)

Második vizsgálati terület ¹		Lyuksűrűség (db/100 m ²) ²				Összes talált lyukak száma ⁷
		Átlag ³	Szórás ⁴	Minimum érték ⁵	Maximum érték ⁶	
Március ⁸	Sz	0,30	1,02	0	6	12
	T	0,23	0,80	0	4	14
Április ⁹	Sz	0,15	0,66	0	4	6
	T	0,17	0,51	0	2	13
Május ¹⁰	Sz	0,00	0,00	0	0	0
	T	0,07	0,34	0	2	5
Augusztus ¹¹	Sz	0,05	0,32	0	2	2
	T	0,48	1,04	0	5	31
Október ¹²	Sz	0,55	2,00	0	12	22
	T	0,00	0,00	0	0	0

Megjegyzés: Sz= szegély, T= tábla

Table 2: Descriptive statistical results based on the measurement of the second study area (Jászfényszaru) The second study area(1), Hole density (piece/100 m²)(2), Average(3), Standard deviation(4), Minimum value(5), Maximum value(6), The total number of holes(7), March(8), April(9), May(10), August(11), October(12);Note: Sz= edge, T= field

Az áprilisi és májusi felméréseknél szórványos mintázatú, alacsony lyuksűrűség mutatkozott. Az áprilisi felmérésnél a táblában talált lyukak elhelyezkedésében a következőket figyeltük meg: több lyuk (6 db) környezetében a tábla összképére jellemzőnél erőteljesebb volt a gyomosodás vagy egy-egy sűrűbb búza foltban helyezkedett el, néhány lyuk (2 db) közvetlen közelében kukoricaszem vagy kukoricacső maradványt (elővetemény) találtunk. A májusi mérésnél a búza már 50-80 cm magas volt, ez gyengíthette az észlelés hatékonyságát.

Az augusztusi mérésnél a szegélyben a magasabb növényzet miatt néhol gyenge volt az észlelhetőség, a táblában azonban minden sávon volt kisemlős lyuk. A mérések alkalmával augusztusban volt a legtöbb kisemlős lyuk, mely felmérés a búza aratása után egy nappal történt. Az októberi mérésnél csak a szegélyben találtunk kisemlős lyukat (lucerna táblák, füves sáv). A vizsgált búzatábla ekkor már szántott állapotban volt.

A térbeli összehasonlítás esetében a március eleji mérésnél a Kruskal-Wallis teszt és a Dunn-féle post hoc próba nem mutatott szignifikáns különbséget a sávok között ($KW= 2,661$; $p= 0,447$; $n= 116$), csakúgy, mint az áprilisi mérés alkalmával ($KW= 3,402$; $p= 0,33$; $n= 116$). A májusi ($KW= 9,594$; $p= 0,022$; $n= 116$) és az augusztusi mérésnél ($KW= 10,523$; $p= 0,015$; $n= 116$) szignifikáns különbség mutatkozott a szegély és a tábla közép között (Dunn próba: $p < 0,05$). Az októberi mérésnél a szegély és a tábla szél között jelentkezett szignifikáns különbség ($KW= 10,011$; $p= 0,019$; $n= 116$; Dunn próba: $p < 0,05$).

Időben vizsgálva a szegély lyuksűrűsége a Friedman teszt ($Fr= 13,007$; $p= 0,011$; $n= 200$) alapján szignifikáns különbséget mutatott, de ezt a Dunn-féle post hoc próba nem támasztotta alá. A tábla szélénél ($Fr= 10,667$; $p= 0,031$; $n= 180$) és a tábla belsőnél ($Fr= 16$; $p= 0,003$; $n= 60$) is csak a Friedman teszt alapján volt szignifikáns a különbség, a Dunn-féle post hoc próba ezt nem erősítette meg. A tábla közép időbeli vizsgálata sem mutatott statisztikailag igazolható különbséget ($Fr= 8,846$; $p= 0,065$; $n= 140$).

Élőhelyválasztás

Az első mintaterületen február végén a sávtípusok alapján történő válogatás a sávtípusok arányán alapuló módszer (Fisher: $p < 0,001$; $n= 229$) és a véletlen pontok eloszlása alapján is kimutatható volt (minden esetben: Fisher: $p < 0,001$; $n= 229$). A kisemlősök a szegélyre kifejezett preferenciát mutattak, míg erős elkerülés jellemezte a tábla szélét, a tábla közepet és a tábla belsőt (3. táblázat).

A második mintaterületen március elején a sávtípusok alapján nem volt statisztikailag igazolható a válogatás (Fisher: $p= 0,479$; $n= 26$). Ezzel egyező eredményt kaptunk a véletlen pontok eloszlásán alapuló módszer esetében is (minden esetben Fisher: $p \geq 0,05$). Augusztusban a válogatás a sávok területi aránya (Fisher: $p= 0,019$; $n= 33$) és a véletlen pontok eloszlása (minden esetben: Fisher: $p < 0,05$; $n= 33$) alapján is szignifikánsnak bizonyult. A talált lyukak és a véletlen pontok eloszlása között a Bonferroni Z-teszt a szegély és a tábla közép esetében mutatott statisztikailag igazolható eltérést (3. táblázat).

A preferencia értékeket tekintve az első vizsgálati területen a szegélyt preferálták a kisemlősök, míg a táblasávokat elkerülés jellemezte. A második mintaterületen a szegélyt elkerülték a kisemlősök, míg a tábla közepét preferálták. A tábla szélre és a tábla belsejére az elkerülés, illetve a preferencia nem volt statisztikailag igazolható (4. táblázat).

3. táblázat

A kisemlős lyukak eloszlása az első és a második vizsgálati területen (Jászfényszaru) a véletlen pontok eloszlásával összehasonlítva

Sáv csoport ¹	Első vizsgálati terület ²					Második vizsgálati terület ³						
	Talált lyuk (db) ⁶	Február ⁴					Talált lyuk (db) ⁷	Augusztus ⁵				
		VE 1	VE 2	VE 3	VE 4	VE 5		VE 1	VE 2	VE 3	VE 4	VE 5
Szegély ⁸	226	***	***	***	***	***	2	**	***	***	***	***
Tábla szél ⁹	0	***	***	***	***	***	10	ns.	ns.	ns.	ns.	ns.
Tábla közép ¹⁰	3	***	***	***	***	***	17	**	***	ns.	***	**
Tábla belső ¹¹	0	***	***	***	***	***	4	ns.	ns.	ns.	ns.	ns.

Megjegyzés: Bonferroni Z-teszt: **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; ns.= nem szignifikáns; VE= véletlen eloszlás

Table 3: Distribution of small mammal holes on the two study areas (in Jászfényszaru) comparing to the distribution of the random points. Stripe group(1), The first study area(2), The second study area(3), February(4), August(5), The measured number of holes (piece)(6), The measured number of holes (piece)(7), Edge(8), Field side(9), Middle of field(10), Inside of field(11); Note: Bonferroni Z-test: **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; ns.= not significant; VE= random distribution

4. táblázat

A kisemlősök élőhelyválasztása az első és a második vizsgálati területen (Jászfényszaru) a különböző felmérések időpontjában

Sáv csoport ¹	Első vizsgálati terület ²		Második vizsgálati terület ³			
	Február ⁴		Március ⁵		Augusztus ⁶	
	Jacobs-index ⁷	Bonferroni Z-teszt ⁸	Jacobs-index ⁹	Bonferroni Z-teszt ¹⁰	Jacobs-index ¹¹	Bonferroni Z-teszt ¹²
Szegély ¹³	0,99	*	-	-	-0,78	*
Tábla szél ¹⁴	-1,00	*	-	-	-0,04	ns.
Tábla közép ¹⁵	-0,91	*	-	-	0,53	*
Tábla belső ¹⁶	-1,00	*	-	-	0,14	ns.

Megjegyzés: Bonferroni Z-teszt: * = $p < 0,05$; ns.= nem szignifikáns

Table 4: Habitat selection of small mammals on the two study areas (in Jászfényszaru) at the time of the various measurements. Stripe group(1), The first study area(2), The second study area(3), February(4), March(5), August(6), Jacobs-index(7), Bonferroni Z-test(8), Jacobs-index(9), Bonferroni Z-test(10), Jacobs-index(11), Bonferroni Z-test(12), Edge(13), Field side(14), Middle of field(15), Inside of field(16); Note: Bonferroni Z-test; * = $p < 0,05$; ns.= not significant

Terjedés

A terjedést a második mintaterületen a márciusi és az augusztusi mérés esetében vizsgáltuk, melyet sávonként végeztünk el. A márciusi mérés elemzése során a szegély és a tábla sávok között többnyire nem volt statisztikailag igazolható különbség (1-es sáv: $p = 0,154$; $n = 13$; 3-as sáv: $p = 1,00$; $n = 12$; 4-es sáv: $p = 0,066$; $n = 14$; 5-ös sáv: $p = 1,00$; $n = 12$). A második sávval összevetve azonban szignifikáns a különbség ($p = 0,011$; $n = 17$). Az augusztusi mérés esetében a márciusi szegély és az augusztusi tábla sávok összevetésénél nem kaptunk szignifikáns különbséget (1-es sáv: $p = 0,062$; $n = 20$; 2-es sáv: $p = 0,109$; $n = 14$; 3-as sáv: $p = 1,00$; $n = 22$; 4-es sáv: $p = 0,446$; $n = 27$; 5-ös sáv: $p = 0,637$; $n = 16$).

KÖVETKEZTETÉSEK

A vizsgálat során térben és időben az első mintaterületen nagy változatosságot lehetett tapasztalni a kisemlős lyuksűrűségben. A mérések során szinte kizárólag a szegélyben kerültek feljegyzésre kisemlős lyukak. A szegélyen belül a térbeli mintázatot elsősorban a fás szárú vegetációval rendelkező szegélyek magasabb lyuksűrűsége jellemezte, az árpával vetett szegélyben (keleti oldal) az első vizsgálati terület tábláját borító repcét megközelítő, alacsony sűrűséget tapasztaltunk. A táblában mért kisemlős lyuksűrűség az egyes mérési időszakokban stabilan alacsony volt, míg a szegélyben mért denzitás erősen fluktuált. Egy bórzsönyi vizsgálat (Márton *et al.* 2014) során hasonló eredményt tapasztaltak, ahol negatív kapcsolat volt kimutatható a nyílt területek aránya és a kisemlős lyuksűrűség között. Ott a nyílt területet több mint 50 %-ban mezőgazdaságilag művelt területek alkották, míg a kisebbik hányad kaszáló volt. Egy másik bórzsönyi tanulmány (Márton és Heltai 2016) az erdő-mezőgazdasági terület élőhelyegyüttes kisemlős faunáját vizsgálta, melynek során a tölgyerdővel szomszédos repcetáblában októbertől augusztusig nem sikerült kisemlőst kimutatni. A vizsgálatunk során kétséget kizáróan nem jelenthető ki, hogy az első mintaterületen a szegélyben talált magasabb kisemlős lyuksűrűség az ökológiai értelemben vett szegélyhatás következménye, okozhatta ezt az is, hogy a bolygatatlan talajú, az év nagy részében takarást és táplálékot nyújtó fás, cserjés vegetáció jobb élőhelyet jelent a kisemlősöknek, mint a művelt terület. Több külföldi vizsgálat során kimutatták, hogy a mezőgazdasági táblát övező, erdő alkotta szegélyzóna, valamint az erdő belseje között a kisemlős faj- és egyedszámban nincs

statisztikailag alátámasztható különbség (*Heske 1995, Sekgororoane és Dilworth 1995, Bayne és Hobson 1998*).

A második mintaterületen a tavasz első felében a szegélyben és a táblában nagyságrendileg azonos mértékben találtunk kisemlős lyukakat. Májusban és augusztusban a kisemlős lyuksűrűség kimutathatóan magasabb volt a tábla középső sávjában, mint a szegélyben. Ez feltehetően a nagyobb mértékű takarás és a feldúsult táplálékkészlet együttes jelenlétével magyarázható (*Lagos et al. 1995, Klein 2007, Márton és Heltai 2016*). Egy dél- ausztráliai vizsgálatban a házi egér (*Mus musculus*) egyedek területi eloszlása a tavaszi és a nyári időszakban közel egyező képet mutatott az általunk talált kisemlős lyuksűrűség területi és időbeli mintázatával (*Newsome 1969*). Októberben a szegélyben statisztikailag igazolhatóan magasabb volt a lyuksűrűség, mint a tábla szélső sávjában. A mintavétel során a tábla szélhez hasonlóan a tábla közép és a belső sáv csoportjában sem találtunk kisemlős lyukat. Az, hogy a sávcsoportok lyuksűrűségénél a szegély lyuksűrűsége miért nem magasabb statisztikailag igazolhatóan, az a tábla belseje felé haladva egyre csökkenő mintavételi szakasz darabszámmal magyarázható (*Reiczigel et al. 2010*). A kisemlős lyukak tábláról való közel teljes eltűnésének hátterében egy általánosan alkalmazott agrotechnikai lépés, az őszi szántás állhat (*Németh 2014*).

Az első vizsgálati területen a kisemlősök élőhelyválasztását február végén a szegély kifejezett preferenciája és a táblán belüli sáv csoportok erős elkerülése jellemezte. Ez a preferencia feltételezhetően a repce júliusi betakarításáig megmaradhatott. Ekkor a táblában nagyon alacsony sűrűségben találtunk kisemlős lyukat, azonban a szegély felmérése a magas és dús vegetáció miatt nem volt lehetséges. A szegély preferenciája felhívja a figyelmet a nagyobb kiterjedésű táblákat (≥ 50 ha) körülvevő fás és cserjés határvegetációk fontosságára a kisemlős életközösségek szempontjából (*Silva et al. 2005, Németh 2014*). A második vizsgálati területen március elején nem volt kimutatható a kisemlősök válogatása a sáv csoportok között, azokat területi kínálatuknak megfelelő arányban használták. Augusztusban a válogatás kimutatható volt, a szegélyt kerülték a kisemlősök, míg a tábla középső része preferált volt. A tábla szél és a tábla belső sáv csoport esetében szignifikáns elkerülés, vagy preferencia nem volt kimutatható, azokat területi arányuknak megfelelően használták a kisemlősök. *Márton és Heltai (2016)* betakarítás előtt álló tavaszi árpában tapasztalt hasonló élőhelyválasztást, melyet a megnövekedett táplálékkínálattal magyaráztak.

A szegélynek a kisémlősök mezőgazdasági táblára történő terjedésében betöltött szerepét vizsgálva elmondható, hogy a szegélyeknek ez a növénytermesztési szempontból negatív funkciója az első vizsgálati területen nem nyert bizonyítást, melyet a mérések során a táblában tapasztalt kifejezetten alacsony lyuksűrűség támaszt alá. A második vizsgálati területen a mintaszámok a márciusi és az augusztusi mérés esetében tették lehetővé a terjedés elemzését. A márciusi mérésnél a szegély és a táblasávok között többnyire nem volt szignifikáns különbség, ez azonban inkább az oldalankénti alacsony mintaszámnak tudható be. A legmagasabb mintaszámmal rendelkező táblasáv esetében (2. sáv: $n=17$) szignifikáns volt a különbség, amely a szegély terjedésben betöltött szerepét nem erősíti meg. Az augusztusi mérés esetében nem kaptunk szignifikáns különbséget a márciusi szegély és az augusztusi táblasávok között, ennek egy része az alacsony mintaszámnak tudható be, két esetben azonban a mintaszám is elegendően magas (3. sáv: $n=22$, 4. sáv: $n=27$), így ez az eredmény a szegély kisémlős terjedést elősegítő szerepének teóriáját erősíti.

A kisémlős lyuksűrűség becslés egy viszonylag jól használható módszer az egér- és pocokfajok állományváltozásainak nyomon követésére (Márton és Heltai 2015), azonban az állományméret pontos becslésére csak korlátozottan alkalmas (Liro 1974), melyet Mackin-Rogalska et al. (1986) vizsgálata is alátámaszt. Lengyelországban egy hektáros mintaterületen minden pocokvárat megjelöltek és feljegyeztek, majd vízzel árasztották el a járatokat és megszámlálták a menekülő egyedet. Az egy pocokvárhoz tartozó egyedszám és a kijáratok száma statisztikailag igazolható pozitív kapcsolatot mutatott, az egy egyedre eső lyuk darabszám magas szórása mellett. A lyukszámlálás minél pontosabb létszámbecslésre történő adaptálása a gyakorlati végrehajtóknak idő- és költséghatékony eljárást jelenthet a kezelések során (Lisická et al. 2007, Márton és Heltai 2015).

A vizsgálat összegzéseként elmondható, hogy a fás, cserjés szegélyeknek a nagytáblás mezőgazdasági környezetben jelentős szerepe lehet a kisémlős életközösségek fennmaradásában, valamint azok populációinak aggregálódásában. Az a hipotézis, miszerint a növénytermesztés szempontjából kártevő rágcsálók a szegélyekből terjednek be a művelt területekre, nem nyert egyértelmű megerősítést, sőt többségében annak ellentmondó eredményt kaptunk. A szegélyeknek a kisémlősökön keresztül a növénytermesztésre gyakorolt közvetett hatásának pontosabb megítéléséhez további vizsgálatok szükségesek, melyek hosszú időtartamon keresztül,

többféle táblaméretet, kultúrnövény fajt és művelési módot foglalnak magukba.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozunk a földhasználóknak, Jászfényszaru Város Önkormányzatának, főképpen Török Imrének, továbbá Győri Ernőnek és ifjabb Győri Ernőnek a mintaterületek biztosításáért.

IRODALOM

- Aschwanden, J., Holzgang, O., Jenni, L. (2007): Importance of ecological compensation areas for small mammals in intensively farmed areas. *Wildlife Biology* 13: 150-158. DOI: [10.2981/0909-6396\(2007\)13\[150:IOECAJ\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2981/0909-6396(2007)13[150:IOECAJ]2.0.CO;2)
- Ángyán J., Menyhért Z. (2004): Alkalmazkodó növénytermesztés, környezet- és tájgazdálkodás. Szaktudás Kiadó Ház, Budapest. 765 p.
- Bayne, E. M., Hobson, K. A. (1998): The effects of habitat fragmentation by forestry and agriculture on the abundance of small mammals in the southern boreal mixedwood forest. *Can. J. Zool.* 76: 62-69 (1998). DOI: [10.1139/z97-171](https://doi.org/10.1139/z97-171)
- Byers, C. L., Steinhorst, R. K., Krausman, P. R. (1984): Clarification of a technique for analysis of utilization-availability data. - *Journal of Wildlife Management*, 48 (3): 1050-1053. DOI: <http://dx.doi.org/10.2307/3801467>
- De la Pena, N. M., Butet, A., Delettre, Y., Paillat, G., Morant, P., Le Du L., Burel, F. (2003): Response of the small mammal community to changes in western French agricultural landscapes. *Landscape Ecology* 18: 265–278. DOI: [10.1023/A:1024452930326](https://doi.org/10.1023/A:1024452930326)
- Faragó S. (2006): Élőhely-gazdálkodás mezői területeken, különös tekintettel a gyepgazdálkodásra. *Gyepgazdálkodási Közlemények* 4: 13-24.
- Fisher R. A. (1922): On the interpretation of χ^2 from contingency tables, and the calculation of P. *Journal of the Royal Statistical Society* 85: 87-94. DOI: <http://dx.doi.org/10.2307/2340521>
- Heltai M. (2014): Élőhelyfejlesztés mezőgazdasági területeken: Szent István Egyetem, Vadgazda Mérnöki Szak, Jegyzet vadgazda mérnöki szakos hallgatók részére. Gödöllő pp. 1-111.
- Heske E. J. (1995): Mammalian abundances on forest-farm edges versus forest interiors in southern illinois: Is there an edge effect? *Journal of Mammalogy*, 76 (2): 562-568. DOI: [10.2307/1382364](https://doi.org/10.2307/1382364)
- Ivány K., Kismányoky T., Ragasits I. (1994): Növénytermesztés. 3., átdolgozott kiadás. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 377 p.
- Jacob J. (2003): Short-term effects of farming practices on populations of common voles. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 95: 321–325. DOI: [10.1016/S0167-8809\(02\)00084-1](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(02)00084-1)
- Jacobs J. (1974): Quantitative measurement of food selection. A modification of the forage ratio and Ivlev's electivity index. *Oecologia*, 14: 413–417. DOI: [10.1007/BF00384581](https://doi.org/10.1007/BF00384581)
- Klein Á. (2007): Bagolysors, A Gyöngybagolyvédelmi Alapítvány félévente megjelenő kiadványa. II. évfolyam 1. szám-2007. Gyöngybagolyvédelmi Alapítvány, Gyömrő. 19 p.

- Kosztka M. (2010): Mezőgazdasági infrastruktúra alapjai 1. A mezőgazdasági infrastruktúra és a mezőgazdasági utak. MGIN1 modul, Nyugat-magyarországi Egyetem, Geoinformatikai Kar, Székesfehérvár, 21 p.
- Lagos, V. O., Contreras, L. C., Meserve, P. L., Gutiérrez, J. R., Jaksic, E. M. (1995): Effects of predation risk on space use by small mammals: a field experiment with a Neotropical rodent. *Oikos* 74: 259-264. DOI: <https://www.istor.org/stable/3545655>
- Liro A. (1974): Renewal of Burrows by the Common Vole as the Indicator of its Numbers. *Acta Theriologica* VOL. 19, 17: 259–272. DOI: [10.4098/AT.arch.74-19](https://doi.org/10.4098/AT.arch.74-19)
- Lisická, L., Losík, J., Zejda, J., Heroldová, M., Nesvadbová, J., Tkadlec, E. (2007): Measurement error in a burrow index to monitor relative population size in the common vole. *Folia Zool.* -56 (2): 169-176.
- Mackin-Rogalska R., Adamczewska-Andrzejewska K., Nabagło L. (1986): Common vole numbers in relation to the utilization of burrow systems. In: *Acta Theriologica*, 31 (2) 17-44. p. DOI: [10.4098/AT.arch.86-2](https://doi.org/10.4098/AT.arch.86-2)
- Márton M., Markolt F., Szabó L., Heltai M. (2014): Niche segregation between two medium-sized carnivores in a hilly area of Hungary. *Annales Zoologici Fennici*, 51: 423-432. DOI: [10.5735/086.051.0503](https://doi.org/10.5735/086.051.0503)
- Márton M., Heltai M. (2015): Kisemlősök állománysűrűségének vizsgálata különböző élőhely-együttesekben. *Vadbiológia* 17. kötet: 78-89.
- Márton M., Heltai M. (2016): Kisemlős populációk vizsgálata a Börzsöny déli oldalán. *Természetvédelmi Közlemények* 22, pp. 73–83, 2016.
- Newsome A. E. (1969): A population study of house-mice temporarily inhabiting a South Australian wheatfield. *Journal of Animal Ecology* 1969 Vol.38 pp. 341-359. DOI: [10.2307/2775](https://doi.org/10.2307/2775)
- Németh Cs. (2014): Kisemlős közösségek vizsgálata a Lajta project erdősávrendszerében. *Magyar Ápróvad Közlemények* 12. 275-356, 2014.
- Pinke Gy. (1999): Veszélyeztetett szegetalis gyomnövények és fenntartásuk lehetőségei európai tapasztalatok alapján. *Kitaibelia* IV. évf. 1. szám: 95–110.
- Radics L. (2010): Fenntartható szemléletű szántóföldi növénytermesztés 1. *Agroinform Kiadó*, Budapest, 700 p.
- Reiczigel J., Harnos A., Solymosi N. (2010): Biostatisztika nem statisztikusoknak. Pars Kft., Nagykövácsi, 462 p.
- Sekgoroane, G. B., Dilworth, T. G. (1995): Relative abundance, richness, and diversity of small mammals at induced forest edges. *Can. J. Zool.* 73: 1432-1437. DOI: [10.1139/z95-168](https://doi.org/10.1139/z95-168)
- Silva, M., Hartling, L., Opps, S. B. (2005): Small mammals in agricultural landscapes of Prince Edward Island (Canada): Effects of habitat characteristics at three different spatial scales. *Biological Conservation* 126 (2005) 556–568. DOI: [10.1016/j.biocon.2005.07.007](https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.07.007)
- Stenseth, N. C., Leirs, H., Skonhoft, A., Davis, S. A., Pech, R. P., Andreassen, H. P., Singleton, G. R., Lima, M., Machang'u, R. S., Makundi, R. H., Zhang, Z., Brown, P. R., Shi D., Wan, X. (2003): Mice, rats, and people: the bio-economics of agricultural rodent pests. *Front Ecol Environ* 2003; 1(7): 367–375. DOI: [10.1890/1540-9295\(2003\)001\[0367:MRAPTJ\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2003)001[0367:MRAPTJ]2.0.CO;2)



Mycotoxins in the food chain

Melinda Kovács^{1,2*}

¹Kaposvár University Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, Mycotoxins in the Food Chain Research Group

²MTA-KE-SZIE Mycotoxins in the Food Chain Research Group
7400 Kaposvár, Guba S. street 40., Hungary

ABSTRACT - The paper is the written version of the scientific presentation given on the 17th meeting of the Alps-Adria Scientific Workshop (on 10 April of 2018 in Hnanice, Czech Republic). Mycotoxins are secondary metabolites of fungi, found all around the world as natural contaminants, still unavoidable in the human food chain. This review gives a summary of the occurrence of the most important mycotoxins in Europe, the predicted effect of climate change on their production and the problem of the co-occurrence of these toxins causing multitoxic effects. Experimental results of the research group confirm the complexity of interactions and the fact that interactive effects are hardly predictable.

Keywords: mycotoxins, climate change, multi-toxic effects

INTRODUCTION

Mycotoxins are fungal secondary metabolites found all around the world as natural contaminants. Secondary metabolites are natural products that have a restricted taxonomic distribution, possess no obvious function in cellular growth and are synthesised by cells that have stopped dividing (Weinberg, 1970). These toxic substances pose risk for human and animal health (so they are of feed and food safety concern) and cause significant economic losses. The Food and Agriculture Organization (2007) estimated that 25% of the world's crops are affected by mycotoxins each year (Smith et al., 2016). Though, according to the most recent reports much higher proportion of the global agricultural commodities is contaminated (maybe even above 80%) (according to Kovalsky et al., 2016).

These naturally occurring toxic metabolites are still unavoidable, but the rate and extent of contamination depends on several biological, environmental, technological, and also human factors. The origin of the problem is the infection of the plants with toxin producing moulds. The interaction between the host plant and the mould is very complex and not yet fully understood. The main environmental factors influencing mould proliferation and mycotoxin production are moisture content and

*CORRESPONDING AUTHOR

Kaposvári Egyetem, Agrár- és Környezettudományi Kar
7400 Kaposvár Guba S. u 40., Tel.: +36-82-505-800
E-mail: kovacs.melinda@ke.hu

temperature. Suboptimal conditions around harvesting and storage may increase severity of infection and contamination.

Mycotoxins may be introduced into the food chain via consumption of contaminated food of plant origin, but because of the possibility of the carry over, in case of certain mycotoxins food of animal origin can also be the source of contamination.

The problem is considered as an unavoidable and unpredictable one, even under good agricultural practice, because environmental factors can't be kept under full control. If they are introduced into the food chain it is very difficult to eliminate them, because they are very stable against heat, or chemical treatments.

The analysis of global mycotoxin occurrence is of particular interest because it helps to identify areas of high risk, which may influence global trade. It also helps to study the effect of climatic change, if we have data year after year. The BIOMIN Mycotoxin Survey is the longest running survey using advanced analytical tools. According to the latest survey 94% of the samples examined were positive worldwide. The most frequently occurring mycotoxins were: deoxynivalenol (DON), fumonisin (FUM) and zearalenone (ZEN). In Central Europe the most prevalent mycotoxin is DON, followed by zearalenone and fumonisins, however T-2 toxin is also a frequent contaminant (BIOMIN, 2017). It is also important to note that 76% of the positive samples contained two or more mycotoxins.

The problem of mycotoxins and the diseases caused by them have been existed since ancient times however the causal relationship was unknown. Nowadays we rarely experience acute mycotoxicoses in developed countries still the economic losses may be significant because of the subclinical or chronic exposure to mycotoxins.

Some examples for the challenges of today related to the problem are: predicted effects of climate change, the co-occurrence of mycotoxins, emerging mycotoxins, „masked“ (hidden / bound) mycotoxins, prevention and protection, global trading, legislation, etc...

EFFECT OF CLIMATE CHANGE ON THE OCCURRENCE OF MYCOTOXINS

According to the prediction of several competent organisations (Intergovernmental Panel on Climate Change, World Meteorological Organization, etc.) a global warming is taking place. Climate change means:

increase in temperature, variation in precipitation, drought and change in the atmospheric CO₂ concentration (Miraglia et al., 2009).

The agricultural sector is particularly sensitive to these changes, which have direct and indirect consequences on food safety and food security, i.e. on the amount of food available, the quality and nutritional value of food and bacterial and chemical food safety.

It has been suggested that effects will be regional, and not obviously detrimental, but depending on geographical region it can be advantageous as well.

Among the main ecological factors influencing the growth and toxin production of moulds, temperature and water activity are determinant. Climate change may affect all ecological factors important in the mycotoxin problem so will influence directly or indirectly mould growth and toxin production. It is important to emphasize that those climatic conditions which favour mould growth are different from those of toxin production. And because those effects which initiate secondary metabolism in fungi are not well classified, the safest way of protection is to prevent mould infection.

Some of the predicted consequences of changing environmental factors are listed below:

Shift in contamination pattern

As a consequence of warm summers, *Fusarium graminearum* has already become dominant in Europe instead of the previously dominant *F. culmorum*. Besides DON and ZEA, *F. graminearum* may produce nivalenol (NIV) as well however there is a big regional difference in NIV production. If a shift in DON/ZEA co-contamination to NIV/ZEA co-contamination can be predicted, depends on the occurrence of the chemotype of *F. graminearum*. According to different studies worldwide, the occurrence of NIV producing *F. graminearum* is different. Only a very few *F. graminearum* isolates have been proved to be NIV producers in the USA (Abramson et al., 2001). On the other hand the presence of significant populations of NIV-producing *F. graminearum* was ascertained (Gale, 2011). In the United Kingdom 71% DON and 25% NIV producing *F. graminearum* chemotypes were isolated and identified (Jennings et al., 2004). According to a survey the occurrence of NIV in Hungary could be linked exclusively with *F. culmorum* (Xu et al., 2008)

According to the scientific opinion of EFSA (2013) the prevalence of *F. graminearum* has already increased in Central Europe, but out of 13164 samples only 783 samples showed co-occurrence of NIV and DON.

Changes in the level of mycotoxin production

Fumonisin are the third most common mycotoxins in Central Europe. They are produced mainly by *F. verticillioides* and *proliferatum*. Because dry weather during grain fill, late-season rains, drought stress and rainfalls following dry periods favour the proliferation of *F. verticillioides*, it can be expected that the foreseen climate change will favour fumonisin production (Miller, 2008).

Several studies support this prediction. E.g. high fumonisin levels and frequent kernel infections by *F. verticillioides* and *F. proliferatum* could be associated with drought stress in Germany (Goertz et al., 2010). A study in Croatia yielded a significant percentage of mycotoxin positive samples in 2011 in which mycotoxins appeared in the frequency order different from that stated for Croatia in 2007. In 2007 DON was the most common mycotoxin in cereals, followed by ZEA and T-2 toxin, whereas FUM was less represented. In 2011 the mean percentage of FUM positive samples was higher than that of T-2 toxin-positive samples, with significantly higher mean FUM concentrations in all analysed cereals (Pleadin et al., 2013).

Previous studies showed that the FUM1 gene, which is a key gene in fumonisin biosynthetic pathway, is affected by environmental stress (Marin et al., 2010). Water stress (drought) might result in increased risk of FUM contamination of maize caused by *F. verticillioides*. This work also suggested that *F. verticillioides* and *F. graminearum* have different regulation patterns of FUM biosynthesis and so their response to changing environmental conditions is also different.

Increase in aflatoxin B1 (AFB1) production

Several studies support the supposition that the biggest problem is expected by the predicted increase in aflatoxin production and the increase of the size of areas affected (EFSA, 2012). Aflatoxin B1 is of special interest, because it is carcinogenic, genotoxic and immunosuppressive. It can cause both acute and chronic toxicity.

A more recently published risk map for AF contamination compared the situation of today and in case of plus 2 and 5 centigrade scenario, respectively (Battilani et al., 2016). The risk has been demonstrated by the aflatoxin hazard

index (AFI), which increases in parallel with temperature. Currently only 20% of the mean AF contamination was predicted to be above the legal level but this rate may increase.

In both climate change scenarios, the most concerned areas with an increase of aflatoxin contamination are: Eastern Europe, Balkan and the Mediterranean regions. On the other hand countries in which maize cultivation is common (Romania, Hungary, France and north-east Italy) show low risk (Figure 1).

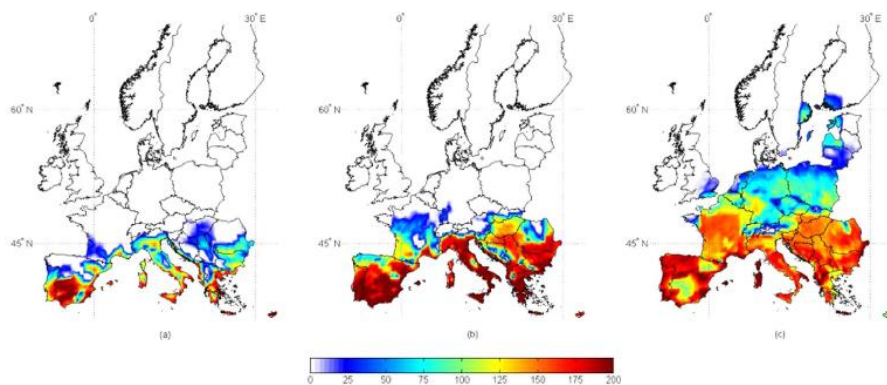


Figure 1. Risk maps for aflatoxin contamination in maize at harvest in 3 different climate scenarios: (a) present, (b) +2 °C, (c) +5 °C. The scale 0–200 refers to the aflatoxin risk index (AFI), higher number indicates increased risk of contamination. (Battilani et. al., 2016)

1. ábra: A kukorica aflatoxin szennyezettségének kockázati térképe három eltérő szcenárió esetén: (a) jelenleg, (b) +2 és (c) +5 °C-os felmelegedés esetén. A 0-200-as skála az aflatoxin indexet (AFI) jelzi, a növekvő érték nagyobb kockázatot jelez. (Battilani és mtsai., 2016)

Changes in biosynthetic pathways

F. graminearum produces DON (as mentioned already earlier as well). Changing water activity (aw) and temperature conditions affect the ratio of DON and its metabolites (15-acetyl-DON and 3-acetyl-DON). According to Leite (2014, in Medina et al., 2017) with decreasing aw the amount of DON decreases, while the amount of its metabolites does not change significantly (Figure 2).

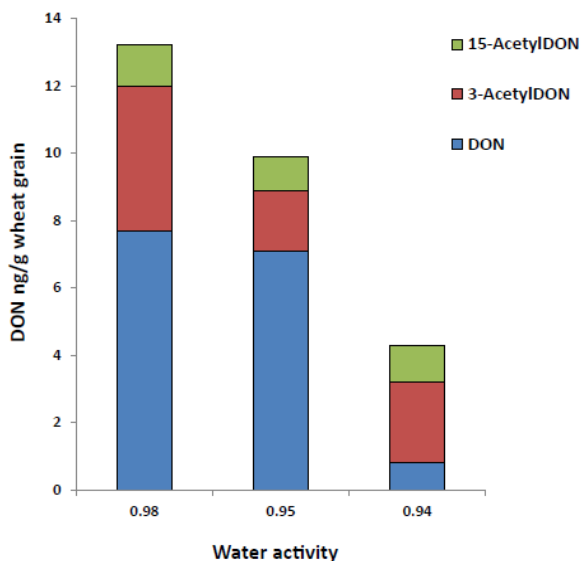


Figure 2. Differential production of DON and its metabolites by *F. graminearum* at different water activity levels (on 25 °C) (Leite, 2014)

2. ábra: A *F. graminearum* által termelt DON és metabolitok mennyisége eltérő vízáktivitás hatására (25 °C-on) (Leite, 2014)

Also for *F. verticillioides* different temperature and aw resulted in altered ratio of the main fumonisin types, i.e. FB1, 2, 3 and 4 (Medina et al., 2017).

Masked mycotoxins are bound compounds produced in the plants mainly as result of detoxification and resistance mechanism. Because climate change affects plant physiology and also causes significant environmental stress for the plants, alteration in the production of masked mycotoxins can also be forecasted (Medina et al., 2017).

It is also important to investigate if altered environmental factors change biosynthetic pathways, up and down regulations of genes in relation to aw and temperature conditions, so if climate change will result in different secondary metabolite production (new mycotoxins?) is not yet known.

CO-OCCURRENCE OF MYCOTOXINS

The topic of co-occurrence of mycotoxin and the interactions and combined effects of them has become a hot topic recently. This is indicated by the large number of scientific papers published in this area: Ibanez-Vea et al. (2012), Rodriguez and Naehrer (2012), Serrano et al. (2012), Streit et al. (2012),

Schatzmayr and Streit (2013), Streit et al. (2013), Alkadri et al. (2014), Gerding et al. (2014), Kovalsky et al. (2016), Smith et al. (2016).

Several surveys indicate that humans and animals are generally exposed to more than one mycotoxin.

This is because:

- similar environmental conditions favour proliferation of several different molds;
- most fungi are able to produce more than one mycotoxin simultaneously in separate foodstuffs;
- animal (and also human) diets generally include several different grain sources which contain different mycotoxins. Especially human diet contains a lot of other foodstuffs which can also contain mycotoxins (coffee, beer, fruits, juices etc.);
- transport of feed and food products across the world due to globalized trade makes the problem more complicated.

In a 3-year survey, between 2010 and 2012, 83 complete feed and feed complement samples were analysed on a total number of 139 mycotoxins and metabolites simultaneously using multi-mycotoxin LC-MS/MS analysis (Streit et al., 2013). Samples contained 7 to 69 metabolites, 66% of the samples was co-contaminated with 16 to 30 compounds (Figure 3).

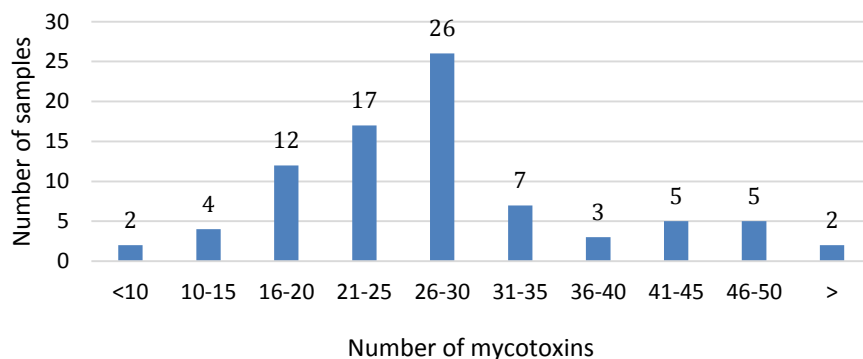


Figure 3. Co-occurrence of mycotoxins between 2010 and 2012 (Streit et al., 2016)

3. ábra: Mikotoxinok együttes előfordulása 2010 és 2012 között (Streit és mtsai., 2016); x tengely: a mikotoxinok száma egy mintában, y tengely: a vizsgált minták száma

The median concentrations of the individual toxins were generally low. Yearly differences were observed regarding concentrations and contamination pattern – presumably due to the different fungal populations on a given year, despite the fact that the cobs were obtained from the same field.

The fact that humans are exposed to more mycotoxins (even if in very low concentrations) has been demonstrated by studies in which exposure was monitored by analysing urine samples.

In a more recent study urine samples of 101 individuals (healthy volunteers) in Germany were analysed by LC-MS/MS for 23 mycotoxins and their urinary metabolites (Gerding et al. 2014). 87% of the samples contained toxic metabolites, and more than half of the positive samples contained two or more compounds. DON and its urinary metabolite (DON-glucuronide) were the most frequent contaminants. The results suggested a low everyday exposure of the investigated German population to mycotoxins. Although 12% of samples exceeded the established TDI (tolerable daily intake) of 1 µg/kg body weight set by the Scientific Committee on Food in 2002.

These results also underline the findings according to which multitoxic effects have to be taken into consideration.

The toxicity of combinations of mycotoxins cannot always be predicted based on their individual toxicities, because individual effects may be influenced by interactions, like antagonism, synergism or additive effects.

In 2011 the French INRA group (Grenier and Oswald, 2011) published the results of a meta-analysis of more than 100 publications describing interactions between mycotoxins.

Among the main conclusions of the analysis were:

- the type of interaction varies according to the parameter measured, is influenced by age, sex, nutritional status, duration and route of exposure, levels etc.;
- the co-exposure of more toxins usually leads to greater total effects compared to the total effect of each individual toxin, i.e., *the whole is greater than the sum of its parts* (Aristotle, 384-322 BC).

This is very important from risk assessment point of view. Risk assessment studies are usually based on the toxicity and occurrence data of individual mycotoxins. It is very important to have reliable data regarding co-occurrence of toxins and their interactions in order to make a better risk assessment, to establish maximum levels and guideline values.

It was also an interesting conclusion that only a few papers investigated the interactions between *Fusarium* toxins which are of major concern worldwide and their co-occurrence has been supported by several surveys, and the number of studies investigating effect of low doses of toxins, representative of field situation is low.

That was the reason why our research group started series of experiments in which the interaction between low doses of the main *Fusarium* mycotoxins are investigated. In these experiments the following parameters were used for monitoring single and combined effects: body weight, feed consumption, blood clinical chemistry, antioxidant and lipidperoxidation parameters, haematotoxicity, comet assay (for genotoxicity) and histopathology.

Single and combined effect of fumonisin B₁ (FB₁) and T-2 toxin in rabbits

The individual and combined effects of 10 mg/kg FB₁ and 2 mg/kg T-2 toxin (n=12/group) mixed with fungal culture of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium sporotrichioides* in feed between 40 and 70 days of age, i.e. for 28 days were investigated in weaned rabbits (Hafner et al., 2016). The T-2 exposure both alone and in combination resulted in 15-18% less final body weight compared to control and FB₁ treatment. There was a significant increase in the concentration of plasma total protein, albumin, fructosamine and creatinine in the group treated with FB₁ compared to the control. The liver and the kidney of most animals treated with T-2 toxin, FB₁ and their combination showed pathological changes, the occurrence of which was more frequent in animals exposed to both toxins. T-2 resulted in depletion of lymphocytes in the spleen. FB₁ and T-2 exerted synergistic effect on the antioxidant/oxidative parameters after 2 weeks of exposure, manifesting in less glutathione and glutathione peroxidase, while more malondialdehyde production. Both toxins caused DNA damage in the lymphocytes, which was more pronounced in the group fed T-2 toxin and T-2 combined with FB₁, without additive or synergistic effects (Table 1).

Interaction between FB₁ and DON + zearalenon in rabbits after 65 days exposure

In this study three, orally administered *Fusarium* toxins were tested on adult Pannon White male rabbits, focusing primarily on their reproduction endpoints (Szabó-Fodor et al., 2015). The four treatments were: control (C, toxin-free diet), F (5 mg/kg FB₁), DZ (1 mg/kg DON + 0.25 mg/kg ZEA), FDZ (5 mg/kg FB₁ + 1 mg/kg DON + 0.25 mg/kg ZEA) for 65 days (n=15/treatment).

Among the mycotoxins studied, additive or less than additive effect was found in case of spermatogenesis and sperm cell morphology, synergism in testosterone production, while FB₁ acted antagonistically against DON+ZEA on genotoxicity. All mycotoxins provoked moderate lipid-peroxidation, based on the changes of glutathione concentration, glutathione peroxidase activity and formation of malondialdehyde and conjugated dienes and trienes, and exerted slight genotoxicity, FB₁ acting antagonistically towards DON+ZEA combination (Table 2).

Table 1.

Type of interaction between 10 mg/kg FB₁ and 2 mg/kg T-2 toxin when administered in feed for rabbits

Parameter examined (1)	Type of interaction (2)
feed intake, body weight (3)	antagonism
TP, ALB, CREA (4)	antagonism
GSH, GPx (5)	antagonism
MDA (6)	synergism
liver, kidney (7)	synergism / additive
Na/K ATPase activity (RBC) (8)	antagonism
genotoxicity (comet assay) (9)	antagonism

1. táblázat: Az interakció típusa 10 mg/kg FB₁ and 2 mg/kg T-2 takarmánnyal történő bevitele esetén nyulakban; (1) a vizsgált paraméter, (2) az interakció típusa, (3) takarmány-felvétel, testsúly, (4) TP (total protein), össz-fehérje, ALB (albumin), CREA (kreatinin), (5) GSH (glutathion), GPx (glutathion-peroxidáz), (6) MDA (malondialdehyd), (7) máj, vese, (8) RBC (red blood cell) vörösvértest Na/K ATP-áz aktivitása, (9) génekárosító hatás (comet assay)

Table 2.

Interaction between 5 ppm FB₁ and 1 ppm DON + 0.25 ppm zearalenon (ZEA) in rabbits after 60 days exposure

Parameter (1)	Type of interaction (2)
feed intake (3)	antagonism (NS)
lipid peroxidation (MDA, GPx, CD, CT) (4)	antagonism
testosterone production (5)	synergism
spermatogenesis (histology) (6)	additive
sperm cell morphology (7)	additive
weight of the spleen (8)	antagonism
genotoxicity (comet assay) (9)	antagonism

NS: not significant

2. táblázat: Az interakció típusa 5 ppm FB₁ és 1 ppm DON + 0,25 ppm zearalenon (ZEA) 60 napos expozícióját követően nyulakban; (1) a vizsgált paraméter, (2) az interakció típusa, (3) takarmány-felvétel, (4) lipid peroxidáció (MDA: malondialdehyd, GPx: glutathion-peroxidáz, CD: konjugált diének, CT: konjugált triének), (5) tesztoszteron termelés, (6) spermatogenezis (szövetten) (7) spermium morfológia, (8) a lép súlya, (9) génekárosító hatás (comet assay)

Interaction between FB₁, DON and zearalenon (ZEA) in rats after 5 days exposure

To test the complex, acute biochemical effects of combined, naturally co-occurring fusariotoxins, a 5-day rat study was performed. Mycotoxin treatment was invented by intraperitoneal injection: FB₁ (F): 9 µg/animal/day, DON (D): 16.5 µg/animal/day and ZEN (Z): 12.75 µg/animal/day. The binary (FD, FZ, DZ) and ternary (FDZ) mixture of toxins was applied in an additive manner. Bodyweight, feed intake and mortality was not affected by any of the treatments. Plasma aspartate transaminase (AST) activity was the highest in FD, FB₁ and DON toxins acting synergistically on it. In the liver reduced glutathione of the control differed from FZ, DZ and FDZ groups; within the toxin-treated groups F was different from FDZ. The hepatic GPx activity of the control group differed significantly from the FZ, DZ and FDZ, with synergism between Z and D, as well as F and D. None of the toxins alone or in combination exerted strong genotoxicity on lymphocytes, neither on the gross histopathological characteristics (Szabó-Fodor et al., submitted to publication).

In these above briefly described experiments low acute / chronic exposure to these combinations of mycotoxins didn't cause typical diseases, but the alterations indicated that the treatments already exceeded the metabolic and detoxification activity of the body.

From several studies related to interactions it has been concluded that because of the incredibly complicity, mycotoxin toxicology should be investigated from a holistic perspective. Integrated use of multi-omics approach is needed to study the molecular events at a comprehensive level (Dellafiora et al., 2017).

CONCLUSION

It is necessary to highlight the multidisciplinary nature of the mycotoxin problem, and to emphasize the importance of collaboration not only between scientists of the different fields (mycology, biochemistry, plant pathology, analytical chemistry, molecular biology, toxicology, food science, medicine, climatology, etc.), but also between scientists, and people working in the practice, in legislation, finance, authorities, etc..

ACKNOWLEDGEMENT

Research and publications related to the referred topics were supported by the following projects: TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0039, GINOP-2.2.1-15-2016-00021, GINOP 2.3.2-15-2016-00046, EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00005.

LIST OF REFERENCES

- Abramson, D., Clear, R. M., Gaba, D., Smith, D. M., Patrick, S. K., Saydak, D. (2001) Trichothecene and moniliformin production by *Fusarium* species from Western Canadian wheat. J. Food Protect., 64. 1220–1225. DOI: [10.4315/0362-028x-64.8.1220](https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.8.1220)
- Alkadri, D., Rubert, J., Prodi, A., Pisi, A., Manes, J., Soler, C. (2014) Natural co-occurrence of mycotoxins in wheat grains from Italy and Syria. Food Chem., 157. 111–118. DOI: [10.1016/j.foodchem.2014.01.052](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.052)
- Battilani, P., Toscano, P., Van der Fels-Klerx, H. J., Moretti, A., Camardo Leggieri, M., Brera, C., Rortais, A., Goumperis, T., Robinson, T. (2016) Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. Scientific Reports, 6. 24328. DOI: [10.1038/srep24328](https://doi.org/10.1038/srep24328)
- BIOMIN (2017) World Mycotoxin Survey, The Global Threat, January to September 2017 <http://www.biomin.net/en/articles/biomin-world-mycotoxin-survey-q3-2017/>
- Dellafiora, L., Dall'Asta, C. (2017) Forthcoming challenges in mycotoxins toxicology research for safer food - A need for multi-omics approach. Toxins, 9. 18. DOI: [10.3390/toxins9010018](https://doi.org/10.3390/toxins9010018)
- European Food Safety Authority (2013) Deoxynivalenol in food and feed: occurrence and exposure. EFSA Journal, 11. 3379.
- European Food Safety Authority (2012) Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change. Scientific Report submitted to EFSA. (Question No. EFSA-Q-2009-00812). <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/2233.htm>
- Gale, L. R., Harrison, S. A., Ward, T. J., O'Donnell, K., Milus, E. A., Gale, S. W., Kistler, H. C. (2011) Nivalenol-type populations of *Fusarium graminearum* and *F. asiaticum* are prevalent on wheat in southern Louisiana. Phytopathol., 101. 124–134.
- Gerding, J., Cramer, B., Humpf, H. U. (2014) Determination of mycotoxin exposure in Germany using an LC-MS/MS multibiomarker approach. Mol. Nutr. Food Res., 58. 2358–2368. DOI: [10.1002/mnfr.201400406](https://doi.org/10.1002/mnfr.201400406)
- Goertz, A., Zuehlke, S., Spittler, M., Steiner, U., Dehne, H. W., Waalwijk, C., de Vries, I., Oerke, E. C. (2010) *Fusarium* species and mycotoxin profiles on commercial maize hybrids in Germany. Eur. J. Plant Pathol., 128. 101–111. DOI: [10.1007/s10658-010-9634-9](https://doi.org/10.1007/s10658-010-9634-9)
- Grenier, B., Oswald, I. P. (2011) Mycotoxin co-contamination of food and feed: meta-analysis of publications describing interactions. World Mycotoxin J., 4. 285–313. DOI: [10.3920/wmj2011.1281](https://doi.org/10.3920/wmj2011.1281)
- Hafner, D., Szabó, A., D'Costa, L., Szabó-Fodor, J., Tornyo, G., Blochné Bodnár, Zs., Ölbeiné Horvátovich, K., Baloghné Zándoki, E., Bóta, B., Kovács, M. (2016) Individual and combined effects of feed artificially contaminated with fumonisin B 1 and T-2 toxin in weaned rabbits. World Mycotoxin J., 9. 613–622. DOI: [10.3920/wmj2016.2067](https://doi.org/10.3920/wmj2016.2067)
- Ibáñez-Vea, M., Martínez, R., González-Peñas, E., Lizarraga, E., López de Cerain, A. (2011) Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in breakfast cereals from Spanish market. Food Control, 22. 1949–1955. DOI: [10.1016/j.foodcont.2011.05.008](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.05.008)
- Jennings, P., Coates, M. E., Walsh, K., Turner, J. A., Nicholson, P. (2004) Determination of deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat crops in England and Wales. Plant Pathol., 53. 643–652. DOI: [10.1111/j.0032-0862.2004.01061.x](https://doi.org/10.1111/j.0032-0862.2004.01061.x)

- Kovalsky, P., Kos, G., Nahrer, K., Schwab, C., Jenkins, T., Schatzmyr, G., Sulyok, M., Krska, R. (2016) Co-occurrence of regulated, masked and emerging mycotoxins and secondary metabolites in finished feed and maize-an extensive survey. *Toxins*, 6. 8(12). pii: E363. DOI: [10.3390/toxins8120363](https://doi.org/10.3390/toxins8120363)
- Leite, G., (2014) Potential for control of spoilage and mycotoxigenic species using mixtures of anti-oxidants, aliphatic acids and molecular approaches using RNAi. PhD Thesis. Cranfield University.
- Marin, P., Magan, N., Vázquez, C., González-Jaén, M. T. (2010) Differential effect of environmental conditions on the growth and regulation of the fumonisin biosynthetic gene FUM1 in the maize pathogens and fumonisin producers *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 73. 303-311. DOI: [10.1111/j.1574-6941.2010.00894.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00894.x)
- Medina, A., Akbar, A., Baazeem, A., Rodriguez, A., Magan, N. (2017). Climate change, food security and mycotoxins: Do we know enough? *Fungal Biol. Rev.*, 31, 143-154. DOI: [10.1016/j.fbr.2017.04.002](https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.04.002)
- Miller, J. D. (2008) Mycotoxins in small grains and maize: Old problems, new challenges. *Food Addit. Contam. Part A*, 25. 219-230. DOI: [10.1080/02652030701744520](https://doi.org/10.1080/02652030701744520)
- Miraglia, M., Marvin, H. J. P., Kleter, G. A., Battilani, P., Brera, C., Coni, E., Cabbada, F., Croci, L., De Santis, B., Denkers, S., Filippi, L., Hutjes, R. W. A., Nordan M. Y., Disante, M., Piva, G., Prandini, A., Toti, L., van den Boon, G., Vespermann, A. (2009) Climate change and food safety. An emerging issue with special focus on Europe. *Food and Chem. Toxicol.*, 47. 1009-1021. DOI: [10.1016/j.fct.2009.02.005](https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.02.005)
- Pleadin, J., Vahcic, N., Persi, N., Sevelj, D., Markov, K., Frece, J. (2013) *Fusarium* mycotoxins' occurrence in cereals harvested from Croatian fields. *Food Control*, 32. 49-54. DOI: [10.1016/j.foodcont.2012.12.002](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.002)
- Rodrigues, I., Naehrer, K. (2012) A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed. *Toxins*, 4. 663-675. DOI: [10.3390/toxins4090663](https://doi.org/10.3390/toxins4090663)
- Schatzmayr, G., Streit, E. (2013) Global occurrence of mycotoxins in the food and feed chain: facts and figures. *World Mycotoxin J.*, 6. 213-222. DOI: [10.3920/wmj2013.1572](https://doi.org/10.3920/wmj2013.1572)
- Serrano, A. B., Font, G., Ruiz, M. J., Ferrer, E. (2012) Co-occurrence and risk assessment of mycotoxins in food and diet from Mediterranean area. *Food Chem.*, 15. 423-429. DOI: [10.1016/j.foodchem.2012.03.064](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.064)
- Smith, M. C., Madec, S., Coton, E., Hymenry, N. (2016) Natural co-occurrence on mycotoxin in foods and feeds and their in vitro combined toxicological effects. *Toxins*, 8. 94. DOI: [10.3390/toxins8040094](https://doi.org/10.3390/toxins8040094)
- Streit, E., Schatzmayr, G., Tassis, P., Tzika, E., Marin, D., Taranu, I., Tabuc, C., Nicolau, A., Aprodu, I., Puel, O. and Oswald, I. P. (2012) Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed-focus on Europe. *Toxins*, 4. 788-809.
- Streit, E., Schwab, C., Sulyok, M., Naehrer, K., Krska, R., Schatzmayr, G. (2013) Multi-mycotoxin screening reveals the occurrence of 139 different secondary metabolites in feed and feed ingredients. *Toxins*, 5. 504-523. DOI: [10.3390/toxins4100788](https://doi.org/10.3390/toxins4100788)
- Szabó-Fodor, J., Kachlek, M., Cseh, S., Somoskői, B., Szabó, A., Blochné Bodnár, Zs., Tornay, G., Mézes, M., Balogh, K., Glávits, R., Hafner, D., Kovács, M. (2015) Individual and combined effects of subchronic exposure of three *Fusarium* toxins (fumonisin B, deoxynivalenol and zearalenone) in rabbit bucks. *J. Clin. Toxicol.*, 5. Paper 264. online DOI: [10.4172/2161-0495.1000264](https://doi.org/10.4172/2161-0495.1000264)
- Szabó-Fodor, J., Szabó, A., Kocsó, D., Marosi, K., Bóta, B., Kachlek, M., Mézes, M., Balogh, K., Kövér, Gy., Nagy, I., Glávits, R., Kovács, M. Interaction between the three frequently co-occurring *Fusarium* mycotoxins in rats. (Submitted to publication)
- Weinberg, E. D. (1970) Biosynthesis of secondary metabolites role of trace metals. *Advan. Microbiol. Physiol.* 4. 1-44. DOI: [10.1016/s0065-2911\(08\)60438-5](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(08)60438-5)
- Xu, X. M., Parry, D. W., Nicholson, P., Thomsett, M. A., Simpson, D., Edwards, S. G., Cooke, B. m., Doohan, F. M., Monaghan, S., Moretti, A., Tocco, G., Mule, G., Hornok, L., Béki, E., Tatnell, J., Ritieni, A. (2008) Within-field variability of *Fusarium* head blight pathogens and their associated mycotoxins. *Eur. J. Plant Pathol.* 120. 21-34. DOI: [10.1007/s10658-007-9189-6](https://doi.org/10.1007/s10658-007-9189-6)

ÖSSZEFOGLALÁS - Mikotoxinok az élelmiszerláncban**Szerző(k):** Kovács Melinda**Intézmény(ek):** (1)Kaposvári Egyetem Agrár- és Környezettudományi Kar, Mikotoxinok az Élelmiszerláncban Kutatócsoport; (2)MTA-KE Mikotoxinok az Élelmiszerláncban Kutatócsoport, 7400 Kaposvár, Guba S. u. 40.

A közlemény a 17. Alpok-Adria tudományos konferencián (Hnanice, Csehország, 2018. április 10-én) elhangzott tudományos előadás anyaga. A mikotoxinok a penészgombák mérgező másodlagos anyagcsere termékei, amelyek világszerte előfordulnak, mint természetes környezetszennyező anyagok. Sajnos, ma még nem iktathatók ki az élelmiszerláncból. A közlemény összefoglalja a klímaváltozás miatt várható változásokat a mikotoxinok termelődésében, valamint az egyes mikotoxinok együttes előfordulásából (multi-toxikus expozíció) adódó problémákat. A kutatócsoport saját kísérleti eredményeivel is alátámasztja a multitoxikus hatások bonyolultságát, valamint azt, hogy az együttes hatás nehezen előrejelezhető.

Kulcsszavak: mikotoxin, klímaváltozás, multi-toxikus hatások



Analysis of melatonin and serotonin from cherries: a review

Éva Varga-Visi*, Ildikó Jócsák, Katalin Lóki, György Végvári

Faculty of Agriculture and Environmental Sciences, Kaposvár University
Guba S. u. 40., H-7400 Kaposvár, Hungary

ABSTRACT - The proper quantification of serotonin and melatonin in different foods is indispensable to evaluate the significance of their dietary intake on blood and plasma levels in humans. This review summarizes the issues regarding the measurements of these compounds from sour cherry and sweet cherry. Sample preparation and analytical methods are discussed, mainly focusing on the liquid chromatographic determination of these compounds, with special respect to their parallel determination in one run.

Keywords: indoleamine derivatives, LC-MS, electrochemical detection, fluorometric detection

INTRODUCTION

The high ingestion pattern of sweet cherries has been reported to be health promoting, including the alleviation of arthritic pain, reducing the risk of cancer and neurodegenerative diseases. These multiple health benefits are significantly linked to the strong antioxidant effect of the fruit. Sweet cherries are good sources of many phytochemicals, including anthocyanin flavonoids and other compounds such as phenolic acids. The total antioxidant activity highly correlates to the concentration of these compounds (Ballistreri et al., 2013; Chockchaisawasdee et al., 2016; Wani et al., 2014; Nawirska-Olszańska et al., 2017).

Melatonin, primarily known as a neurohormon in mammals, also occurs in sweet cherries as a phytohormone; parallel with serotonin, its precursor that has a neurotransmitter role in mammals. Moreover, melatonin possesses antioxidant properties, therefore it can contribute to the antioxidant capacity of the fruit. These indoleamine derivatives can be originated from food besides endogenous formation in human as they can be absorbed and enter the bloodstream. The level of dietary intake may have an influence on their levels in blood and tissues and may contribute to their physiological effects, nevertheless, the degree of this contribution is still not completely elucidated (Garcia-Parrilla et al., 2009, González-Gómez & Lozano, 2009; Feng et al., 2014;

*CORRESPONDING AUTHOR

Kaposvár University, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences
Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Health, Department of Biochemistry
H-7400 Kaposvár, Guba S. str. 40., Tel.: +36-82-505-800
E-mail: varganeva@ke.hu

Kirakosyan et al., 2009). Moreover, there is scarce information available in the literature on the melatonin and serotonin content of fruits, especially in the case of sweet cherries. One of the factors that render these studies complicated is that the quantification of indoleamine derivatives is difficult from food matrices. The aim of this brief outline is to summarise the possibilities of the analysis of serotonin and melatonin from cherries.

Sample preparation

Fruit tissues are usually freeze-dried prior to extraction as it was applied to different cherry cultivars and their products (*Burkhardt et al.*, 2001, *González-Gómez & Lozano*, 2009; *Kirakosyan et al.*, 2009; *Kocadağlı et al.*, 2014; *Rosado et al.*, 2017) and also for several commonly consumed fruits (*Huang & Mazza*, 2011). Contrary, some authors (*Homoki et al.*, 2015; *Islam et al.*, 2016, *Reinholds et al.*, 2016) used freshly crushed fruits to extract indoleamines.

There are large differences among the extraction solvents and techniques that are used to obtain indoleamine derivatives (*Table 1.*) with one exception, i.e. all of the authors carried out extraction under dim light in order to avoid the degradation of analytes. As indole ring is sensitive to light, exposure to UV light can completely destroy this compound in standard solutions (*Huang & Mazza*, 2011). Serotonin and melatonin have amphipathic characteristic, therefore, the choice of solvent is difficult in order to obtain complete recovery (*Garcia-Parilla et al.*, 2009). The ratio of organic/aqueous solvent used for extraction ranged from 0 to 100% in the method descriptions cited in *Table 1*. Some of the authors purified the resulting extract with an additional extraction step (*Burkhardt et al.*, 2001, *González-Gómez & Lozano*, 2009; *Huang & Mazza*, 2011, *Homoki et al.*, 2015) or with SPE (*Kirakosyan et al.*, 2009; *Reinholds et al.*, 2016; *Rosado et al.*, 2017), while others did not (*Kocadağlı et al.*, 2014; *Islam et al.*, 2016, *Özen and Ekşi*, 2016). As the chemistry of plants is very complex, coelution of compounds with similar characteristic may cause false results, therefore the clearing of the extract with a purification step is advantageous. On the other hand, including a further step may cause lower recovery, moreover, it was reported that melatonin can be decomposed by the impurities being present in organic solvents (*Feng et al.*, 2014).

The amino group of serotonin can be protonated, resulting in an increase in the solubility of the molecule in aqueous systems. The pH values of the aqueous extraction solutions were set to 8.0 or below this value (*Table 1.*) according to the pK value of serotonin (10.4 ± 0.2 , *Chattopadhyay et al.*, 1996). In the case of inclusion of a purification step with an organic solvent the aqueous extract has

to be alkalify prior to extraction in order to obtain an acceptable recovery (González-Gómez and Lozano, 2009). For melatonin, the acidic hydrolysis of the amide group is promoted at low pH, if the temperature is elevated, nevertheless, extraction usually occurs at room temperature. Authors, who aimed the simultaneous determination of serotonin and melatonin (González-Gómez & Lozano, 2009; Huang & Mazza, 2011; Özen and Ekşi, 2016), did not use solutions with acidic pH during extraction. The parallel extraction of these two indoleamine derivatives from cherry is very scarce in the literature. Huang and Mazza (2011) reported good recovery in methanol extracts for both serotonin (100.9%) and melatonin (101.3%). However, ethyl acetate, the purifying solvent, was not appropriate for the extraction of serotonin at all, giving zero recovery for this compound. As a result, the clear-up step with ethyl acetate/water was applied only for melatonin and not for serotonin. The absence of this step might be one of the reasons why the LOQ was more than three orders of magnitude higher for serotonin than for melatonin (Table 1). González-Gómez and Lozano (2009) reported similar LOD values for melatonin and serotonin and their purification step with 0.1 M KOH/chloroform can be applied for both indoleamine derivatives; nevertheless, the recoveries were lower than in the previous report.

Analytical measurement

Melatonin is widely distributed in higher plants and plant foods but its concentration is in low ppb range, therefore, its quantification is difficult (Kocadağlı et al., 2014). However, several chromatographic and immunoanalytical methods have been reported to be successful. Immunological techniques include enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunoprecipitation and radioimmunoassay (RIA) (Kocadağlı et al., 2014; Garcia-Parrilla et al., 2009; Feng et al., 2014). In the case of RIA, melatonin levels were reported higher compared to results based on GC-MS. A possible explanation was the presence of a compound that cross-reacted with melatonin antiserum (Garcia-Parrilla et al., 2009; Feng et al., 2014). Indoleamine derivatives are thermally labile at the temperatures of gas chromatographic (GC) separation and they are nonvolatile, therefore derivatisation is necessary to improve their stability and volatility. Most often trifluoroacetyl or trimethylsilyl derivatives are analysed using nonpolar stationary phases. Despite the resolution power, and high sensitivity of GC-MS, the use of this technique is scarce for the analysis of melatonin, owing to the

Table 1.
Serotonin and melatonin content of various cherries and some of the reported analytical conditions of measurements

Sample	Melatonin (µg/kg)	Serotonin (µg/kg)	Extraction and purification	Analytical method	LOD	LOQ	References
<i>Prunus cerasus</i> 2 cultivars (tart cherries)	2.06 - 13.46		phosphate buffer (pH=8.0); KOH, chloroform	HPLC-ECD			Burkhardt et al., 2001
<i>Prunus avium</i> 8 cultivars (sweet cherries)	0.006 - 0.224	0.028 - 0.376	phosphate buffer (pH=8.0); KOH, chloroform	HPLC-MS (ESI-quadrupole MS)	melatonin: 4.30* serotonin: 3.00*		González-Gómez & Lozano, 2009
<i>Prunus cerasus</i> 2 cultivars (tart cherries)	2.9 - 12.3		methanol/water (80:20 v/v)	HPLC-MS (ESI-triple quadrupole MS)			Kirakosyan et al., 2009
2 cultivars (sweet cherries)	n.d.	n.d.	methanol; ethyl acetate/water (6:5, v/v)	HPLC-MS (ESI-ion trap tandem MS)	melatonin: 0.01* serotonin: 50*	melatonin: 0.03* serotonin: 150*	Huang & Mazza, 2011
Sour cherry	n.d.		ethanol	HPLC-MS (ESI-triple quadrupole MS)	melatonin: 14.4**	melatonin: 48.1**	Kocadagli et al., 2014
Sour cherries (9 cultivars)	20.3 - 1592.8		phosphate buffer; chloroform	HPLC-DAD (identification: MALDI TOF MS and NMR)			Homoki et al., 2015
<i>Prunus avium</i>		170	0.2 M perchloric acid solution	HPLC-FD	serotonin: 1.56*	serotonin: 5.2*	Islam et al., 2016
Sour cherries (9 varieties)	0.14 - 13.8*	1.17 - 2.13*	methanol	HPLC-MS (ESI-triple quadrupole MS)			Özen and Eksiş, 2016
<i>Prunus cerasus</i> 18 cultivars (tart cherries)	n.d.		ethyl acetate, magnesium sulphate; SPE (C-18)	UHPLC-MS (ESI-ion trap MS)		melatonin: 5**	Reinholds et al., 2016
5 cherry cultivars	11.36 - 27.62		methanol; SPE (polymeric RP)	HPLC-ECD		melatonin: 25*	Rosado et al., 2017

n.d. = not detected; * ng/mL, ** ng/kg

need of derivatization and deuterium-labelled internal standards for accurate quantification (*Harumi & Matsushima, 2000*).

The most widespread technique for the analysis of melatonin is high-performance liquid chromatography (HPLC) used in tandem with electrochemical (ECD) or fluorometric detectors (FD) or coupled to mass spectrometer (MS) (*Garcia-Parrilla et al., 2009; Kocadağlı et al., 2014; Feng et al., 2014*). Most of the methods have used reversed phase systems for the separation of compounds, including C18 or C8 columns, and mobile phases containing formate, acetate or phosphate buffer (pH=3.4-4.8) with acetonitrile or methanol (*Burkhardt et al., 2001, Harumi & Matsushima, 2000; Garcia-Parrilla et al., 2009; Feng et al., 2014; Homoki et al., 2015; Rosado et al., 2017*).

Electrochemical detection is based on the electro-oxidation of the analytes on the electrode surface. The setting of the applied potential highly effects the sensitivity of the detection. In the case of melatonin assay, its maximum value is usually between 700 and 900 V (*Harumi & Matsushima, 2000; Sharma et al., 2018*). In general, these sensors are highly sensitive and they have wide linear response. However, reusability and reproducibility can be reduced by the oxidation products which absorb on the surface of the electrode (*Sharma et al., 2018*). In order to avoid the shortening the lifetime of the electrode the ratio of organic solvent in the mobile phase should be kept below 20-30% (v/v) (*Harumi & Matsushima, 2000; Feng et al., 2014*). This limit may cause difficulties to carry out analysis at a reasonable time in reversed phase gradient elution because the preferable ratio of the strong eluent (methanol or acetonitrile) in order to eluate highly absorbing contaminants at a reasonable time is much higher than this limit value.

Indoleamine derivatives can also be detected with a spectrofluorometer, as indole is highly fluorescent (*Bridges & Williams, 1968*). The applied ranges of excitation and emission wavelength are within the ranges of 230-300 nm and 340-355 nm, respectively (*Harumi & Matsushima, 2000; Feng et al., 2014; Islam et al., 2016*). The advantage of FD over ECD is that higher ratio of organic solvents can be used in gradient elution. Contrary, FD is less sensitive than ECD, based on the reported detection limits of melatonin (*Harumi & Matsushima, 2000*). The pre-concentration of the sample extract was necessary when melatonin was measured from grape-related foodstuff (*Mercolini et al., 2012*). In the case of cherry melatonin content was measured with HPLC-MS or with HPLC-ECD and not with HPLC-FD (*Table 1*).

The melatonin content of different cherry cultivars varied over a wide range (*Table 1*). *Huang and Mazza (2011)* did not detect melatonin in sweet

cherry, while melatonin was measured from other fruits in the range of 0.01-0.1 µg/kg. *Kocadağlı and co-workers* (2014), moreover, *Reinholds and co-workers* (2016) also reported the absence of this indoleamine derivative in cherry, with quantification limits in the range of 0.05-0.005 µg/kg.

Analysis of serotonin can be obtained with the same techniques like melatonin, including immunoanalytical and chromatographic methods (*Sharma et al.*, 2018). There is approximately three orders of magnitude difference between the presented values of cherries (*Table 1*). *Islam and co-workers* (2016) presented the validation and application of an HPLC-FD method. The serotonin, tryptophan and tryptamine content of various fruits and vegetables, including root and shoot vegetables were determined, melatonin was not measured. They used 5-hydroxy-tryptophane as an internal standard, although this compound is also part of the biosynthetic pathway of serotonin (*Feng et al.*, 2014). In the experiment of *González-Gómez and Lozano* (2009) the serotonin content of cherry was measured parallel to that of melatonin. The concentrations of the two indoleamines were very similar, being in the sub ppb range. In the assay of *Huang and Mazza* (2011) serotonin content of sweet cherry was below LOD.

The most important factors which contributed to the observed wide variation in the concentration of indoleamine derivatives were reported as variety and growth condition of cherries (*Reinholds et al.*, 2016), however, there were also large differences in the degree of validation of the analytical methods used for these studies.

Simultaneous analysis of indoleamine derivatives with HPLC-MS

HPLC-MS has gained popularity for the determination of thermally labile trace compounds being present in complex samples. This fact can partially be explained by the achievement of MS interface technology. The two main parts of an analytical method development are the optimization of the separation and the detection of the compounds. Indoleamine derivatives were separated from trans- and cis-piceid and trans- and cis-resveratrol on a C18 HPLC column using gradient elution with acetonitrile and 0.1% (v/v) formic acid, from 5 to 100%, within 40 minutes (*Huang & Mazza*, 2011). In the absence of interfering compounds, serotonin and melatonin by themselves can be separated within 15 min, using higher increment of the stronger solvent (*González-Gómez & Lozano*, 2009). Parallel determination of serotonin and melatonin was carried out using electrospray ionization (ESI) in HPLC-MS systems. Parameters for ESI can be optimised with the direct introduction of

standard solution into the ionization source in order to find the optimal capillary temperature and spray voltage for ionization. Spray voltage of 3.50 and 4.00 kV were found as optimal for serotonin and melatonin, respectively, while 250 °C capillary temperature was the best for both compounds (Huang & Mazza, 2011). These indoleamines are prone to the formation of positive ions with the addition of a proton to their nitrogen atom; therefore the positive ion mode was used for the formation of quasimolecular ions, m/z 233 for melatonin and m/z 177 for serotonin (González-Gómez & Lozano, 2009; Huang & Mazza, 2011). Huang and Mazza (2011) applied tandem MS to detect the fragmentation pathways from precursor ions at m/z 233 and at m/z 177 and quantified their results based on the monitoring of the most abundant fragment ions.

CONCLUSIONS

Determination of indoleamine derivatives has been started decades ago, however, the primary investigations referred to animal organs, like pineal gland. The analysis of serotonin and melatonin from foods gain actuality following the millennium. In the case of fresh fruits, like sour and sweet cherry, the available literature is limited, despite the fact that the rapid development of HPLC-MS enabled the possibility of the accurate and precise measurement of compounds with low volatility and thermal instability. The reported concentration values cover a wide range, and the factors affecting the serotonin and melatonin levels in cherries have not been completely elucidated. The improvement of selectivity and sensitivity of the analytical methods are key issues to provide reliable data on these trace compounds in foods.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by project „EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00005” co-funded from EU sources and European Structural and Investment Funds and the Hungarian State.

REFERENCES

- Ballistreri, G., Continella, A., Gentile, A., Amenta, M., Fabroni, S. & Rapisarda, P. (2013). Fruit quality and bioactive compounds relevant to human health of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in Italy. Food Chem., 140, 630–638. DOI: [10.1016/j.foodchem.2012.11.024](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.024)

- Burkhardt, S., Tan, D.X., Manchester, L.C., Hardeland, R. & Reiter, R.J. (2001). Detection and quantification of the antioxidant melatonin in Montmorency and Balaton tart cherries (*Prunus cerasus*). J. Agric. Food Chem., 10, 4898–4902. DOI: [10.1021/jf010321+](https://doi.org/10.1021/jf010321+)
- Bridges, J.W. & Williams, R. (1968). The fluorescence of indoles and aniline derivatives. Biochem. J., 107, 225–237. DOI: [10.1042/bj1070225](https://doi.org/10.1042/bj1070225)
- Chattopadhyay, A., Rukmini, R., Mukherjee, S. (1996). Photophysics of a neurotransmitter: ionization and spectroscopic properties of serotonin. Biophys. J., 71, 1952–1960. DOI: [10.1016/s0006-3495\(96\)79393-1](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(96)79393-1)
- Chockchaisawasdee, S., Golding, J.B., Vuong, Q.V., Papoutsis, K. & Stathopoulos C.E. (2016). Sweet cherry: Composition, postharvest preservation, processing and trends for its future use. Trends Food Sci. Tech., 55, 72–83. DOI: [10.1016/j.tifs.2016.07.002](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.07.002)
- Feng, X., Wang, M., Zhao, Y., Han, P. & Dai, Y. (2014). Melatonin from different fruit sources, functional roles, and analytical methods. Trends Food Sci. Tech., 37, 21–31. DOI: [10.1016/j.tifs.2014.02.001](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.02.001)
- Garcia-Parrilla, M. C., Cantos, E. & Troncoso, A.M. (2009). Analysis of melatonin in foods. Study Review. J. Food Compos. Anal., 22, 177–183. DOI: [10.1016/j.jfca.2008.09.009](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.09.009)
- González-Gómez, D., Lozano, M., Fernández-León, M.F., Ayuso, M.C., Bernalte, M. J. & Rodríguez, A.B. (2009). Detection and quantification of melatonin and serotonin in eight Sweet Cherry cultivars (*Prunus avium* L.). Eur. Food Res. Technol., 229, 223–229. DOI: [10.1007/s00217-009-1042-z](https://doi.org/10.1007/s00217-009-1042-z)
- Harumi, T. & Matsushima, S. (2000). Separation and assay methods for melatonin and its precursors. Review. J. Chrom. B, 747, 95–110. DOI: [10.1016/s0378-4347\(00\)00064-5](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(00)00064-5)
- Homoki, J. R., Gyémánt, Gy., Remenyik J. (2015). Régi hormon új csodája: magyarországi meggyfajták mint természetes melatonin források. Agrártudományi Közlemények, 63, 65–72. WEB: https://dea.lib.unideb.hu/dea/bitstream/handle/2437/235429/FILE_UP_0_acta2015_63_37.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Huang, X. & Mazza, G. (2011). Simultaneous analysis of serotonin, melatonin, piceid and resveratrol in fruits using liquid chromatography tandem mass spectrometry. J. Chrom. A, 1218, 3890–3899. DOI: [10.1016/j.chroma.2011.04.049](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.049)
- Islam, J., Shirakawa, H., Nguyen, T.K., Aso, H. & Komai, M. (2016). Simultaneous analysis of serotonin, tryptophan and tryptamine levels in common fresh fruits and vegetables in Japan using fluorescence HPLC. Food Biosci., 13, 56–59. DOI: [10.1016/j.fbio.2015.12.006](https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.12.006)
- Kirakosyan, A., Seymour, E.M., Llanes, D.E.U., Kaufman, P.B. & Bolling, S.F. (2009). Chemical profile and antioxidant capacities of tart cherry products. Food Chem., 115, 20–25. DOI: [10.1016/j.foodchem.2008.11.042](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.042)
- Kocadağlı, T., Yılmaz, C. & Gökmen, V. (2014). Determination of melatonin and its isomer in foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Food Chem., 153, 151–156. DOI: [10.1016/j.foodchem.2013.12.036](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.036)
- Mercolini, L., Mandrioli, R. & Raggi, M.A. (2012). Content of melatonin and other antioxidants in grape-related foodstuffs: measurement using a MEPS-HPLC-F method. J. Pineal Res., 53, 21–28. DOI: [10.1111/j.1600-079x.2011.00967.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.2011.00967.x)
- Nawirska-Olszańska, A., Kolniak-Ostek, J., Oziembłowski, M., Ticha, A., Hyšpler, R., Zadak, Z., Židová, P. & Paprstein, F. (2017). Comparison of old cherry cultivars grown in Czech Republic by chemical composition and bioactive compounds. Food Chem., 228, 136–142. DOI: [10.1016/j.foodchem.2017.01.154](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.154)
- Özen, İ. T., Ekşi, A. (2016). Melatonin and serotonin content of the main sour cherry varieties and commercially produced sour cherry concentrates. European International Journal of Science and Technology, 5, 57–64. WEB: https://www.eijst.org.uk/images/frontImages/gallery/Vol_5_No_4/7_57-64.pdf

- Reinholds, I., Pugajeva, I., Radenkovs, V., Rjabova, J., Bartkevics, V. (2016). Development and validation of new ultra-high performance liquid chromatography-hybrid quadrupole-Orbitrap mass spectrometry method for determination of melatonin in fruits. J. Chrom. Sci., 54, 977–984. DOI: [10.1093/chromsci/bmw030](https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw030)
- Rosado, T., Henriques, I., Gallardo, E., Duarte, A. P. (2017). Determination of melatonin levels in different cherry cultivars by high-performance liquid chromatography coupled to electrochemical detection. Eur. Food Res. Technol., 243, 1749–1757. DOI: [10.1007/s00217-017-2880-8](https://doi.org/10.1007/s00217-017-2880-8)
- Sharma, S., Singh, N., Tomar, V. & Chandra, R. (2018). A review on electrochemical detection of serotonin based on surface modified electrodes. Biosens. Bioelectron., 107, 76–93. DOI: [10.1016/j.bios.2018.02.013](https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.02.013)
- Wani, A.A., Singh, P., Gul, K., Wani, M.H. & Langowski, H.C. (2014). Sweet cherry (*Prunus avium*): Critical factors affecting the composition and shelf life. Food Packaging and Shelf Life, 5, 86–99. DOI: [10.1016/j.fpsl.2014.01.005](https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2014.01.005)